

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA I**



TESIS DOCTORAL

**Reconstitución artificial de proteínas asociadas a
citoesqueleto en sistemas modelo de membrana: un
estudio biofísico de su función mecánica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Silvia Isanta Amela

DIRECTOR

Francisco Monroy Muñoz

Madrid, 2017

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA – FÍSICA I
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

The seal of the University of Complutense of Madrid is a large, faint watermark in the background. It features a central shield with a red and yellow checkered pattern, topped by a crown and a swan. The shield is surrounded by a circular border containing the text 'VIRI PRUDENTES' and 'COMPLUTENSIS'.

Reconstitución artificial de proteínas asociadas a citoesqueleto en sistemas modelo de membrana: un estudio biofísico de su función mecánica

Memoria para la obtención al Grado de Doctor
Presentada por Silvia Isanta Amela
Dirigida por Francisco Monroy Muñoz

Madrid, 2015

Agradecimientos:

En primer lugar agradecer a la **Universidad Complutense de Madrid** la posibilidad de realizar esta tesis doctoral en el Departamento de Química Física I.

Agradecer al **grupo de Membranas Biológicas y Bioreología** que me acogió desde un inicio, gracias Paco por enseñarme todo lo que sé, gracias Iván por ser siempre el “Post-Doc” que enseña y apoya, gracias Ruddi por enseñarme a hacer vesículas, gracias Lauri por animarme desde un principio, gracias Lara por no sólo ayudarme experimentalmente sino también anímicamente en todo el camino recorrido, gracias Eli por todo lo que hemos vivido juntas, gracias Mike por ser nuestro alemán españolizado, gracias Diego por ser un buen amigo y darme tanto ánimo al final del camino, gracias Julia por las risas desde el frikimalismo, gracias Yoli por cuidarnos como parte de la familia. No sólo habéis sido buenos mentores sino también buenos amigos.

Agradecer a **los profesores** que me han impartido clase en la carrera de Ciencias Químicas de la UCM y del Máster de Bioquímica que han hecho que llegue donde estoy ahora, sin olvidarme de Dña Marisa y Don Javier, profesores de mi colegio que me animaron a realizar una carrera de “bata”.

A los **alumnos y profesores del departamento** que, pese a mis ausencias por motivos personales, siempre os habéis preocupado por mí, gracias a todos los que habéis hecho de este largo camino sinuoso y con grandes baches algo llevadero, gracias por haber formado parte de mi vida y llevarme a buenos amigos (Ana, Moni, Marta, Mac, Jacobo, Rami, Garreth, Lufi, Rebeca, Patri, Richard, Palomain, Sonia, Sara, Victor, Vicente, Andrés, Paolo, Miriam, MJ, Jorge, Juanjo, Maria, Isaac, Samu...). Gracias a los **compañeros de universidad** por hacerlo más llevadero, a inorgánicos, analíticas, orgánicos, sobretudo este último verano de comidas en Físicas (Nacho, Sandra, Palomo, Mari, Laura, Noe, Irene, Laura...). También agradecer a mis **amigos y compañeros de carrera**, todo empezó con ellos, por los que empezamos y por los que terminamos (Yoli, Mariu, Javi, Martas, Poti, Couso, Anabel, Alberto, Oscar, Eli, Chiki, Bea, Eva, Anita, Pili, Noti, Amaiyita...).

Agradecer a **mis amigos** por todo el apoyo moral, por hacerme olvidar de los problemas, por salir a bailar, por las vacaciones, las bodas, las despedidas, los nuevos integrantes, los amigos peludos, por formar una gran familia (Nacho, Belén, Rous, Marina, Fran, Minion, Angelón, Coto, Iñaki, Tali, Zorel, Niobe, Sara, Pedrito, Ivan, Amaia, Sori, Carlos, Bárbara, Alberto, Ceci, Raul, Camo, Carlos, María, Mada, Gema), gracias a mis **bailongos** por ser parte de mi vida, gracias a todos. Agradecer a mi **Academia** (Mar, Marieta, Rodri, Reich, Alex...) por vuestra comprensión este último año y buenos ratos, aunque estresantes, con los que he aprendido mucho, de igual modo agradecer a todos mis **alumnos**, el maestro también aprende.

Gracias a mi **familia**, por todo el apoyo, por quererme incondicionalmente, por confiar en mí, por sacarme de mis casillas con la pregunta temida de... “Bueno, ¿y cuándo terminará esto?”.

Pues aquí está.

Gracias, en especial, **a Guille**, sin él no habría sido capaz.

A la meva família

Índice

Agradecimientos:	III
Índice de figuras	11
Listado de Tablas	19
<i>Lista de abreviaturas</i>	21
<i>Lista de símbolos</i>	23
Parte I: INTRODUCCIÓN	25
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	27
1.1 LA MEMBRANA CELULAR.....	29
1.1.1. Breve historia de los estudios de la membrana celular.....	31
1.1.2. Estructura de la membrana lipídica	33
1.1.3. Integrantes de la membrana celular	34
1.2 SISTEMAS ARTIFICIALES DE MEMBRANA MODELO	42
1.1.6. Monocapas lipídicas.....	43
1.1.7. Vesículas lipídicas	43
1.3 PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS MEMBRANAS.....	45
1.3.1. Propiedades termodinámicas (en equilibrio).....	46
1.3.2. Propiedades mecánicas.....	50
1.3.2.1. Fluctuaciones de membrana.....	51
1.3.2.1.1. Espectro de fluctuaciones.....	52
1.3.2.1.2. Dinámica de membranas.....	53
1.4 PROTEÍNAS DE ADHESIÓN CELULAR: CADHERINAS.....	54
1.4.1. Proteínas y adhesión celular	55
1.4.2. Las cadherinas como proteína de adhesión	56
1.4.3. Estructura de las cadherinas.....	57
1.4.4. Uniones entre cadherinas.....	59
1.4.4.1. Base estructural de la adhesión homofílica.....	59
1.4.5. Física de la adhesión celular	61
1.5 CITOESQUELETO EUCARIOTA: CÓRTEX DE ACTINA.....	63
1.5.1. Estructura	64
1.5.2. Polimerización	65
Relación con la membrana plasmática.....	67
1.6 ESQUELETO DE MEMBRANA DEL GLÓBULO ROJO	68
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	77

CAPÍTULO 3	MATERIALES Y MÉTODOS	81
3.1.	REACTIVOS EMPLEADOS	83
3.1.1.	<i>Disoluciones tamponadas</i>	83
3.1.2.	<i>Lípidos</i>	83
3.1.3.	<i>Fluorescencia</i>	83
3.2.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE MEMBRANA DE ERITROCITO (EME).....	84
3.3.	OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	85
3.3.1.	<i>Actina</i>	85
3.3.2.	Purificación de C-Cadherina	86
3.4.	PREPARACIÓN DE MONOCAPAS	88
3.5.	PREPARACIÓN DE VESÍCULAS LIPÍDICAS (LUVs Y GUVs).....	90
3.5.1.	Preparación de <i>LUVs</i>	92
3.5.2.	Preparación de <i>GUVs</i>	93
3.6.	TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	95
3.6.1.	Microscopía óptica y fluorescente.....	95
3.6.1.1.	Técnica de aspiración con micropipetas.....	96
3.6.1.2.	Técnica de análisis de contorno	97
3.6.2.	Microscopía confocal.....	99
3.6.3.	Crio-microscopía de transmisión electrónica (Crio-TEM)	100
Parte II	RESULTADOS	105
CAPÍTULO 4:	MECÁNICA DE ADHESIÓN CELULAR MEDIADA POR C-CADHERINA	107
4.1.	INTRODUCCIÓN	109
4.2.	ABORDAJE EXPERIMENTAL.....	109
4.2.1.	Formación del sistema artificial	110
4.2.2.	Análisis de resultados: energética	111
4.3.	RESULTADOS.....	114
4.3.1.	Contactos adhesivos	114
4.3.1.1.	<i>Adhesión para $N = 2$</i>	114
4.3.1.2.	<i>Contacto adhesivo $N \geq 2$</i>	117
4.3.2.	Espectros de fluctuaciones.....	120
4.3.3.	Dinámica de la adhesión.....	121
4.3.3.1.	<i>Adhesión reversible</i>	123

4.3.4. Energías adhesivas.....	126
4.3.5. Caracterización microscópica estructural.....	129
4.4. CONCLUSIONES.....	131
4.5. AGRADECIMIENTOS.....	131
CAPÍTULO 5: ESTUDIO REOLÓGICO DE LA ACTINA COMO PROTEÍNA DE CITOESQUELETO ..	135
5.1. INTRODUCCIÓN	137
5.2. ABORDAJE EXPERIMENTAL: <i>anclaje puramente electrostático vs covalente</i> .	140
5.2.1. <i>Viscoelasticidad de compresión</i>	141
5.2.2. <i>Viscoelasticidad de cizalla</i>	146
5.3. RESULTADOS.....	147
5.3.1. <i>Experimentos de viscoelasticidad de compresión</i>	148
5.3.2. <i>Viscoelasticidad de cizalla: fluidificación activa</i>	156
5.3.3. <i>Mecanismo molecular: ¿Movimiento de “treadmilling”?</i>	157
5.4. CONCLUSIONES.....	158
5.5. AGRADECIMIENTOS.....	158
CAPÍTULO 6: EL GLÓBULO ROJO COMO SISTEMA MODELO: DIAGRAMA DE FASES Y MECÁNICA	161
6.1. INTRODUCCIÓN GLÓBULO ROJO.....	163
6.2. ABORDAJE EXPERIMENTAL.....	164
6.2.1. <i>Estudio reológico del extracto de membrana de eritrocito (EME)</i>	165
6.3. RESULTADOS.....	167
6.3.1. <i>Citoesqueleto en monocapas de sistemas modelo RBC en 2D</i>	167
6.3.2. <i>Citoesqueleto en sistemas modelo RBC en 3D</i>	175
6.3.2.1. <i>Diagrama de fases con lípidos sintéticos</i>	175
6.3.2.2. <i>Lípido sintético en presencia de EME</i>	182
6.3.2.3. <i>Diagrama de fases con extracto de RBC</i>	184
6.3.2.4. <i>Mecánica de membranas</i>	185
6.4. CONCLUSIONES.....	188
6.5. AGRADECIMIENTOS.....	188
Parte III DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	191
CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN INTEGRADORA	193
CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES	199
Parte IV: RESUMEN DE LA TESIS	203
Resumen:.....	205

<i>Abstract:</i>	210
ANEXOS	215
<i>Anexo 1: Estructuras de los distintos lípidos.....</i>	<i>217</i>
<i>Anexo 2: estructura de las sondas fluorescentes lipídicas.....</i>	<i>218</i>

Índice de figuras

figura 1-1-1: Ilustración de los componentes de una célula eucariota (extraída de Proyecto Biosfera, MEC)	29
figura 1-1-2: Microfotografía electrónica de una membrana celular (2)	30
figura 1-1-3: Breve historia de los modelos de las estructuras moleculares. a) Estudio realizado por Gorter y Grendel empleando una balanza de Langmuir, para medir la cantidad de lípido que era necesario para rodear la célula al expandirse sobre una superficie acuosa, concluyendo que las membranas de los glóbulos rojos contienen el suficiente lípido para formar una bicapa lipídica. b) En 1935, Daveson y Danielli propusieron el modelo “tipo sándwich” formado por una bicapa de lípidos rodeada de proteínas globulares, más adelante, en 1954, mostraron una nueva versión del modelo, mostrando en la bicapa lipídica poros formados por una capa monomolecular de proteínas (c). d) Estructura del modelo del mosaico fluido de Singer y Nicolson en 1972 propuesto inicialmente. Al contrario que los modelos estructurales anteriores, en este modelo de membrana las proteínas se encuentran insertadas en la bicapa. e) Representación actual de la membrana plasmática donde se muestra la misma organización básica propuesta por Singer y Nicolson. En la superficie externa de la mayoría de las proteínas, y de algunos fosfolípidos, contiene cadenas de oligosacáridos, formando glucoproteínas o glucolípidos. Las dos monocapas de la membrana contienen lípidos distintos en distinta proporción y la membrana externa contiene los “rafts” lipídicos que consisten en agrupaciones de especies lipídicas específicas. (11; 2; 12)	32
figura 1-1-4: Contribuciones a la fuerza intermembrana: (a) atracción de Van der Waals entre dipolos eléctricos, (b) repulsión electrostática entre bicapas cargadas y (c) repulsión entrópica entre membranas fluctuando. (14)	33
figura 1-1-5: Imagen adaptada de “ <i>Fluid lipid membranes – a premier</i> ” de Markus Deserno (13) . Arriba izquierda, reacción de esterificación de una cadena hidrocarbonada con una molécula de glicerol para formar un ácido graso; derecha, dibujo esquemático de la estructura atómica de una molécula de fosfolípido genérica. Abajo, esquema detallado de un fosfolípido, donde se observan las partes fundamentales como son la cola hidrofóbica, formada por las dos cadenas acílicas, saturada e insaturada, y la cabeza hidrofílica con sus tres componentes principales, el grupo glicerol, el grupo fosfato y el grupo de la cabeza que dará la funcionalidad a la molécula.	36
figura 1-1-6: <i>Hipótesis de formas</i> . Relación estructural entre la forma del lípido como monómero y los agregados, lo cual influye en el polimorfismo lipídico. El parámetro de forma, S , es la relación entre en volumen y el área de la cabeza polar y la longitud de cadena. Cuando $S \approx 1$, el lípido tiene una forma cilíndrica y en medio acuoso puede formar bicapas estables (fase lamelar). Cuando $S > 1$, el lípido tiende a agregarse formando micelas (fase HI) y cuando $S < 1$, tiende a formar micelas inversas (fase HII). Imagen adaptada del libro “ <i>Membrane Structural Biology</i> ”, M. Luckey (14).	39
figura 1-1-7: Esquema de los distintos estados físicos de las bicapas en un medio acuoso en función de la temperatura y composición (15)	41
figura 1-1-8: Estructura química de la molécula de colesterol, obtenida de <i>Avanti Polar Lipids</i>	41
figura 1-1-9: Dibujos de los distintos modelos de vesículas lipídicas que se emplean como modelos de membrana.	43
figura 1-1-10: Diagrama energético de los diferentes agregados lipídicos. El valor de energía mínima de cada estructura está colocado sólo aproximadamente. Si el módulo de curvatura elástica es bajo, la diferencia de energía entre LUV y SUV disminuye debido a la contribución entrópica (39).....	44
figura 1-1-11 Representación esquemática de una isoterma π -A de una monocapa lipídica y las estructuras características a cada estado de presión (40)	48
figura 1-1-12: Modos de deformación de una membrana.....	50
figura 1-4-13: Primeras fases del desarrollo embrionario en fase morular. Las células embrionarias tempranas en los primeros días se mantienen unidas de forma débil. Cerca de la octava fase del	

desarrollo comienzan a expresar E-cadherina y da como resultado una adhesión fuerte y cercana de unas células con otras. Imagen tomada de Gerald Karp “ <i>Cell and Molecular Biology Concepts</i> ”.	55
figura 1-4-14 Ejemplos de regulación por cadherinas en la morfogénesis tisular. (<i>Adaptada de Barry M. Gumbiner, Nature Review, 2005</i>) (54).	56
figura 1-4-15: Izquierda, dibujo de la estructura de la cadherina donde se presenta el dominio extracelular, fragmento transmembrana y fragmento citosólico (conjunto de cateninas) que interaccionan con la actina, proteína de citoesqueleto. Derecha, detalle de la estructura laminar un ectodominio, en verde Ca^{2+} .	58
figura 1-4-16: Arriba a la izquierda se observa la adhesión entre dos ectodominios de cadherina en el N-terminal de células opuestas, mostrándose el sitio de unión ampliado. Abajo se muestra de modo esquemático la unión <i>cis</i> entre cadherinas de la misma célula y la unión <i>trans</i> de cadherinas de células adyacentes y su representación en forma de clúster adhesivo. En la fotografía de <i>cryo-TEM</i> , arriba a la derecha, se observan las zonas de adhesión desmosomales (74; 75).	60
figura 1-4-17: Adhesión de vesículas a un sustrato desde el punto de vista macroscópico con un área de contacto A^* y una curvatura de contacto de $1/R^*$. A la derecha, punto de vista mesoscópico donde se observa la zona de unión fluctuante con un potencial $V(l)$ el cual tiene su mínimo típicamente aproximado en 10 nm sobre el sustrato. Imagen tomada de (79)	61
figura 1-4-18 Formas calculadas de vesículas adheridas. A la izquierda se observa el régimen de adhesión débil; a la derecha el régimen de adhesión fuerte. Ésta última forma suele ser de tipo caperuza esférica con un ángulo de contacto efectivo ψ_{eff} . Imagen tomada de (79).	62
figura 1-5-19: Ilustración de un gel activo formado por filamentos de actina, motores de miosina y entrecruzamientos pasivos (no mostrado). Los procesos de polimerización y despolimerización se indican con las siglas k_p y k_d . imagen modificada de (83).	64
figura 1-5-20: Estructuras de la actina en la forma globular (G – actina) y fibrilar (F – actina). Imagen izquierda, al fondo se observa la disposición de los monómeros de actina formando el filamento con forma de hélice dextrógira. El giro se repite cada 37 nm y todas las subunidades tienen la misma orientación, en la ampliación, se observa el monómero de actina con el nucleótido (ATP o ADP) unido en el centro de la molécula. Imagen derecha, micrografía electrónica de los filamentos de actina con tinción negativa.	65
figura 1-5-21: a) Etapas en la polimerización de la actina, desde la G-actina a la F-actina. Se puede observar que la polimerización es un proceso reversible regulado por constantes cinéticas. b) Dibujo de la estructura de un monómero de actina.	66
figura 1-5-22 El “ <i>treadmilling</i> ” de los filamentos de actina, hace posible que, mediante la hidrólisis del nucleósido trifosfato, se añada la siguiente subunidad. (a) Esquema gráfico del “ <i>treadmilling</i> ”. (b) El <i>treadmilling</i> sucede en el rango intermedio de concentraciones de subunidades libres. La concentración crítica de polimerización en el extremo final de un filamento con la forma T es menor que para la forma D. Si la concentración real se encuentra entre ambos valores, el “extremo más” crece mientras que el “extremo menos” se contrae, produciéndose el fenómeno del “ <i>treadmilling</i> ”.	67
figura 1-6-23: Imagen tomada del libro de Gerald Karp “ <i>Cell and Molecular Biology Concepts</i> ”. En ella se muestra el dibujo de la estructura de la membrana celular del eritrocito donde se observa la red de espectrina formada por las distintas proteínas implicadas (2).	68
figura 1-6-24: Arriba, gráficos representativos del porcentaje lipídico en la membrana del glóbulo rojo. Abajo, gráfico de las proporciones de lípido presentes en la <i>membrana interna</i> del glóbulo rojo...	69
figura 1-6-25: Estructura del citoesqueleto de espectrina del glóbulo rojo. En él se observan las distintas proteínas implicadas. (Imagen modificada de (53)).	70
figura 3-1 Estructura de la actina en forma globular (izquierda) y fibrilar (derecha) en estado nativo (obtenida de la base de datos PDB)	85
figura 3-2: Plásmido de expresión con C-cadherina-His.	86

figura 3-3 Fotografías de la obtención de proteína mediante SDS-PAGE (gel de electroforesis) y mediante la técnica de Western-Blott. A la izquierda se observa el gel teñido con azul de Coomassie y a la derecha se observa el marcaje con un anticuerpo anti-His-tag en un <i>Western – Blott</i> . En ambos ensayos bioquímicos se aprecia una pureza aproximada del 99%.	87
figura 3-4: Dibujo esquemático del experimento de reología de cizalla. A la <i>izquierda</i> la vista aérea; a la <i>derecha</i> la vista lateral del rotor bicónico.	88
figura 3-5: Balanza de Langmuir comercial, NIMA 702 BAM.	88
figura 3-6: Representación esquemática de los tipos de liposomas en función de su tamaño y número de lamelas.	91
figura 3-7: Representación esquemática de la formación de liposomas mediante la técnica de extrusión y fotografía del extrusor empleado (imagen obtenida de avestin Liposofast Inc.)	92
figura 3-8: <i>Arriba:</i> instalación experimental para la preparación de vesículas unilamelares gigantes mediante la técnica de electroformación. Las placas ITO se ensamblan de tal manera que forman una cámara para la formación de las GUVs, la cual se conecta a un generador de corriente alterna mediante unos hilos conductores, en nuestro caso, de cobre. A la <i>derecha</i> se muestra una toma de cerca de uno de los métodos para formar películas lipídicas. <i>Abajo:</i> dibujo esquemático de la celda de electroformación.	94
figura 3-9: Microscopio Nikon Eclipse TE2000 empleado para los estudios de fluorescencia y vídeo-microscopía de contraste de fases.	96
figura 3-10: Microscopio Nikon Eclipse TE2000 empleado con el sistema de micromanipulación integrado. Con cambios en la altura del depósito de agua del motor se producen los cambios de presión en las pipetas, produciéndose la succión o expulsión de las vesículas.	97
figura 3-11: Fotografía del microscopio confocal perteneciente al grupo de investigación del Dr. Iván López Montero de la facultad de Ciencias Químicas de la UCM.	100
figura 3-12: Fotografía del microscopio electrónico del centro nacional de biotecnología, dirigido por el Dr. José María Valpuesta.	101
figura 4-1: Dibujo esquemático del abordaje experimental del sistema formado por Ni-NTA y DOPC, como formadores de membrana, y el ectodominio de la cadherina unido al lípido de anclaje mediante el <i>tag</i> de 6 histidinas.	110
figura 4-2: Imagen tomada de (3), donde se muestra el contacto adhesivo entre dos vesículas, junto con las tensiones de membrana y los ángulos de contacto.	112
figura 4-3: Dibujo esquemático de la adhesión de dos vesículas con los parámetros definidos: L, longitud del contacto adhesivo; σ , tensión de membrana; D, diámetro de la vesícula; Ψ , ángulo de contacto.	113
figura 4-4: Imágenes de experimentos de adhesión y experimentos control, según sea específica (presencia de cadherina) o inespecífica (ausencia de cadherina), en presencia de los distintos iones. Se observa una clara diferencia entre los cuatro experimentos: (a) en amarillo el canal lipídico, donde se observa una adhesión inespecífica mediada por calcio con bordes adhesivos redondos; (b) (c) y (d) en verde el canal de fluorescencia de proteína, donde se observa en (b) una adhesión fuerte con los bordes clásicos rectos presentes en la adhesión celular, en (c) una adhesión muy débil mediada por Mg^{2+} , y en (d) la ausencia de adhesión cuando está presente en el medio el compuesto quelante de calcio (AEDT) o en presencia de K^+ . Abajo los correspondientes perfiles de intensidad de fluorescencia donde se observa que el pico central, correspondiente a la unión adhesiva, es más del doble que los picos correspondientes a la membrana lipídica señalando la presencia de cadherinas en la unión.	114
figura 4-5: Gráfica de ángulos de contacto en ausencia de cadherina, es decir, adhesiones inespecíficas mediadas por iones calcio, y presencia de cadherina e iones calcio en la muestra, adhesiones específicas.	115
figura 4-6: <i>Izquierda</i> , gráfica donde se muestra el estudio de la variación de la intensidad del contacto adhesivo como relación de i_{adh}/i_0 en el canal de fluorescencia de la proteína. <i>Derecha</i> , dos	

escenarios distintos de adhesión de dos vesículas distintas en función del tipo de incubación con el anticuerpo fluorescente. <i>Arriba</i> , incubación de la proteína con el anticuerpo en un primer paso y posterior incubación con las vesículas, observándose la fluorescencia con gran intensidad en la zona del contacto adhesivo. <i>Abajo</i> , incubación de las vesículas con la proteína en un primer paso y posterior incubación con el anticuerpo fluorescente, observándose que en la zona del contacto adhesivo no ha podido penetrar el anticuerpo, mostrando fluorescencia en el resto de membrana debido a la proteína que haya quedado sin interactuar. Siendo las fotografías en color naranja el canal de observación de lípido y verde el de proteína.	116
figura 4-7: <i>Arriba</i> , fotografía de una agregación de vesículas donde se observa la tendencia a formar ángulos de 120° en el contacto adhesivo. <i>Abajo</i> , gráfica donde se muestra la estadística para 86 muestras distintas, de la tendencia de los ángulos de contacto para $n > 2$ vesículas.	117
figura 4-8: <i>Izquierda</i> , gráfica donde se muestra el estudio de la variación de la intensidad del contacto adhesivo como relación de i_{adh}/i_0 , siendo i_{adh} la intensidad en el contacto adhesivo, e i_0 la intensidad de un punto de la membrana, representados los perfiles representativos de tres muestras distintas a la <i>derecha</i>	118
figura 4-9: <i>Arriba</i> , muestra de un multiplete en sus canales de fluorescencia, rhodamine red X para el canal lipídico, alexa 488 antibody para el canal de proteína y merge para la mezcla de los dos donde se ve más intensidad en las zonas de unión. <i>Abajo</i> , multiplates con las diversas geometrías presentes en las mezclas.	119
figura 4-10: Espectro de fluctuaciones para la mezcla de lípidos DOPC – Ni-NTA, donde se observa una pendiente de -1 en el régimen dominado por la tensión y -3 para kappa.	120
figura 4-11: Experimento de la cinética de adhesión para dos vesículas de $30\ \mu m$ en función de la longitud del contacto adhesivo.	121
figura 4-12: Comparativa de distintas tomas para la misma concentración del 5% en cadherina. Se observa que el régimen es de tipo difusivo. Todas llegan al mismo valor de máximo en un tiempo parecido.	122
figura 4-13: En esta gráfica se observan las curvas cinéticas de adhesión para los casos en los que el porcentaje de proteína es del 5, 10 y 20 %. Cabe destacar en el caso del 5 % la velocidad es mayor, hasta alcanzar el valor de $plateau\ L/D \approx 1$ que para los casos del 10% y 20%. <i>Es debido a que, al haber mayor cantidad de proteína, y ser un proceso difusivo, como se vio en figura 4-12, hay mayor densidad de proteína y su movimiento es más lento.</i>	122
figura 4-14: Imágenes representativas del pegado – despegado de dos vesículas sujetas con micropipetas.	123
figura 4-15: Esquema del experimento de succión con micropipetas de dos vesículas adheridas.....	124
figura 4-16: Representación gráfica de la variación del contacto adhesivo respecto al diámetro de la vesícula adherida en función del área en exceso, donde se observa un cambio de régimen debido a la energía de adhesión. En la gráfica insertada se observa que la tensión de la membrana sigue un régimen lineal respecto al área en exceso, lo cual indica que el cambio de régimen en la gráfica anterior no depende de la tensión de la membrana. <i>Arriba</i> se muestran las fotografías de las distintas fases de la adhesión.	125
figura 4-17: <i>Abajo</i> , gráfica donde se muestran las energías adhesivas en función de la concentración de proteína expresada en porcentaje de lípido Ni-NTA donde se observa la gran diferencia entre un sistema dominado por una adhesión inespecífica, mediada por un catión divalente, y por un sistema dominado por una adhesión específica mediada por cadherinas. <i>Arriba</i> se muestran las imágenes típicas de los dos tipos adhesivos.....	126
figura 4-18: Representación de la variación de la longitud adhesiva respecto al diámetro de la vesícula en función de la cantidad de proteína expresada como el porcentaje de lípido Ni-NTA para los distintos experimentos realizados, adhesión específica (cadherina en presencia de iones calcio), inespecífica (presencia de iones magnesio), y de no adhesión (presencia de iones monovalentes o agentes quelantes de calcio).	127

- figura 4-19:** Representación de las energías de adhesión para distintas concentraciones de cadherina expresadas en función del porcentaje de lípido Ni-NTA presente en la membrana. Se observa un aumento de la energía que se estabiliza a partir del 10 %, donde parece que la proteína de la muestra está en exceso y es por ello que a mayores concentraciones son más frecuentes los multipletes que los dobletes con los que somos capaces de estudiar la energía adhesiva.128
- figura 4-20:** Caracterización estructural de la unión entre dos membranas mediante cadherinas.....129
- figura 4-21:** Imágenes de crio-microscopía electrónica de transmisión para muestras de liposomas en presencia de proteína donde se observan bordes rectos debido a las adhesiones entre los liposomas, con la formación de cremalleras de cadherinas. Estas muestras se realizaron en condiciones de alta concentración de proteína con un 30% de lípido Ni-NTA.....130
- figura 5.1-1:** Dibujo esquemático del abordaje experimental. A la izquierda el esquema de la unión de tipo electrostático, donde la actina se une mediante la interacción de cargas. A la derecha el esquema de la unión electrostática + covalente, donde aparte de la interacción de las cargas de la membrana y la proteína hay un punto de anclaje covalente aportado por el lip-NHS.141
- figura 5.1-2:** Procedimiento de inyección de lípidos sobre la superficie de la subfase antes de realizarse los experimentos.142
- figura 5.1-3:** Balanza de Langmuir comercial NIMA 702 BAM143
- figura 5.1-4:** Representación de la deformación realizada a la monocapa mediante los experimentos de oscilación: área vs. tiempo sería la deformación aplicada y la presión vs. tiempo la respuesta del sistema a dicha deformación.....145
- figura 5.1-5.** Izquierda, isoterma de compresión π -A de las monocapas de lípidos considerados en este estudio (línea negra, a 22°C y con una velocidad de compresión de 0.03 min⁻¹). Derecha, módulo de compresión calculado como la derivada numérica de la curva π -a (línea roja).147
- figura 5.1-6** Interacción electrostática (80% POPC + 20% DODA). (a) En el panel superior se observan las imágenes por microscopía de contraste de fases y fluorescencia de GUVs compuestas de 80% POPC + 20% DODA (imagen de la izquierda es sólo composición de lípidos; imagen central es la mezcla lipídica con actina en campo claro y la derecha la misma pero en el campo fluorescente). La gráfica de la derecha es el perfil de intensidad de la GUV en el campo fluorescente. En el panel inferior es el control para la no-adsorción de actina en GUVs sólo de POPC. (b) Medida del módulo dinámico de elasticidad ($\epsilon(\omega)$ con símbolos rellenos) y la pérdida de viscosidad ($\omega\kappa(\omega)$: símbolos huecos) medidos en función de la frecuencia (ω) en experimentos con barrera oscilatoria con monocapas de POPC + DODA (80:20): (●) en ausencia de F-actina; (■) en presencia de actina (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La línea punteada horizontal corresponde al módulo de compresión de equilibrio (ϵ_0). (c) Isotherma de compresión de las monocapas de POPC + DODA (80:20) comparadas antes (---) y después (—) de la unión con F-actina. (d) Módulo de compresión de equilibrio obtenido mediante los datos de (c). (e) Viscosidad dinámica de compresión, $\kappa(\omega)$, calculada a partir del módulo de pérdidas en (b); los símbolos siguen la misma estructura que en (b).149
- figura 5.1-7.** Unión electrostática: condiciones de deslizamiento *izquierda*: módulo dinámico de elasticidad, $\epsilon(\omega)$, medido en función de la frecuencia de deformación (ω) en los experimentos de oscilación de barrera con monocapas formadas por POPC + DODA (80:20): (o) en ausencia de F-actina; (●) en presencia de F-actina (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los distintos escalones corresponden a las distintas presiones superficiales de la monocapa de lípidos (π ; los valores están representados con los números en negrita). La línea horizontal corresponde al valor del módulo de compresión de equilibrio medido a cada presión (ϵ_0 ; números expresados entre paréntesis). *Derecha*: viscosidad dinámica de compresión, $\eta(\omega)$ (los símbolos son los mismos que en la figura de la derecha).150
- figura 5.1-8:** Aumento de la presión superficial ($\Delta\pi$) debido a la adsorción de la F-actina en la monocapa de POPC con una presión inicial πI . el valor numérico de la presión superficial se puede interpretar como el aumento en la energía superficial debido a la adsorción de la proteína. La adsorción inespecífica ($\Delta\pi > 0$) sólo ocurre a presiones superficiales inferiores a la presión de esparcimiento

- de la actina ($\pi l < \pi_{spr} \approx 18 \text{ mN} \cdot \text{m} - 1$, línea de puntos verticales). La no adsorción de la proteína se detecta a altos empaquetamientos lipídicos ($\Delta\pi \approx 0$ a $\pi l > \pi_{spr}$). 152
- figura 5.1-9** Unión covalente POPC, DODA y lip-NHS. (a) Panel superior: imágenes de microscopía óptica de contraste de fases en campo claro y fluorescencia para una mezcla de POPC + lip-NHS (80:20) (izquierda: sólo mezcla lipídica; centro: lípidos incubados con actina; derecha: la misma figura que centro pero en el canal fluorescente). los perfiles de intensidad de fluorescencia están en la cuarta columna. panel inferior: sistema compuesto por popc + doda + lip-nhs (70:20:10). (b) Módulo dinámico de elasticidad ($\epsilon(\omega)$: símbolos rellenos) y la pérdida de viscosidad ($\omega\kappa(\omega)$: símbolos huecos) medidos en función de la frecuencia (ω) en experimentos con barrera oscilatoria con monocapas de POPC + DODA + lip-NHS (70:20:10): (●) en ausencia de f-actina; (■) en presencia de actina ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). La línea punteada horizontal corresponde al módulo de compresión de equilibrio (ϵ_0). figura insertada: representación de la fuerza de relajación calculada como la diferencia del módulo dinámico y el valor de equilibrio ($\delta\epsilon = \epsilon(\omega) - \epsilon_0$, obtenido a partir de (b)). La línea con pendiente +1 representa un incremento tipo Maxwell. 154
- figura 5.1-10** (a) Viscosidad de compresión dinámica, $\kappa(\omega)$, medida en función de la frecuencia de deformación en experimentos de barrera oscilatoria en monocapas compuestas de POPC + DODA + lip-NHS (70:20:10): (o) en ausencia de F-actina; (□) en presencia de F-actina ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). (b) estimación de la fuerza de relajación, siguiendo la misma leyenda que (a). (c) Tiempos de relajación de compresión. 155
- figura 5.1-11** *Izquierda*: módulo dinámico de elasticidad, $\epsilon(\omega)$, medido en función de la frecuencia de deformación (ω) en los experimentos de oscilación de barrera con monocapas formadas por POPC + DODA + lip-NHS (70:20:10): (o) en ausencia de F-actina; (●) en presencia de F-actina ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Los distintos escalones corresponden a las distintas presiones superficiales de la monocapa de lípidos (π ; los valores están representados con los números en negrita). La línea horizontal corresponde al valor del módulo de compresión de equilibrio medido a cada presión (ϵ_0 ; números expresados entre paréntesis). *Derecha*: viscosidad dinámica de compresión, $\eta(\omega)$ (los símbolos son los mismos que en la figura de la derecha). 156
- figura 5.1-12.** (a) Efecto de la unión de la F-actina al la viscosidad de cizalla superficial en monocapas de popc con: (a) un 20% del lípido catiónico DODA, (b) con el 20% de DODA y un 10% del lípido PEG funcionalizado (lip-NHS). Cada flecha indica los volúmenes de las alícuotas que se van inyectando en función del tiempo ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). La concentración final de proteína es de $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ por cada 100 μg . La evolución temporal en (b) (electrostático + covalente) muestra una fluidificación activa de la monocapa hacia una mayor fluidificación correspondiente a la interfase desnuda (sin capa orgánica). 157
- figura 6.1-1:** *Imagen adaptada de (2)*. Gel de electroforesis de poliacrilamida de las proteínas asociadas a las membranas del eritrocito. Las proteínas integrales de membrana y las participantes en el citoesqueleto de membrana se clasifican por su movilidad electroforética en el gel de poliacrilamida. Tanto en a, como en b se muestran las bandas más características. 163
- figura 6.3-1** Variación del módulo elástico y presión en función de la velocidad de compresión de la monocapa de POPC. 168
- figura 6.3-2:** Dibujo esquemático de la reorganización del extracto de membrana al ser inyectado bajo la monocapa de lípidos para las distintas presiones iniciales empleadas en este estudio. (EME = ●) 168
- figura 6.3-3:** *Arriba izquierda*, se muestra la representación de los valores obtenidos del módulo elástico de compresión en función de la presión de la monocapa, se observa una disminución del módulo a medida que aumenta la presión inicial de inyección del extracto de membrana bajo monocapa; *arriba derecha*, se observa la variación del módulo elástico de compresión en función de las presiones características de membrana, a estados de bajas presiones ($\pi = 20 \text{ mN/m}$, en rojo), a presiones bajas ($\pi = 30 \text{ mN/m}$ en azul) y a altas presiones ($\pi = 40 \text{ mN/m}$ en negro); *abajo*, gráfica representativa de la variación de presión, respecto a la presión inicial de inserción del

extracto en la monocapa, donde se observa un claro aumento hasta una presión de 10 mn/m a partir de la cual empieza a disminuir dicha variación, indicando una aproximación del grado de inserción del extracto de membrana a la monocapa de POPC.....	169
figura 6.3-4: Variación de la presión en función del área en ausencia de ATP (línea roja discontinua) y en presencia de ATP (línea negra continua).	170
figura 6.3-5: Experimentos en monocapas de langmuir de POPC y extracto de membrana de glóbulo rojo en presencia de la disolución tamponada con ATP 2 mM. Se define $\pi_{0\text{ ins}}$ como la presión inicial tras ser inyectado el extracto de membrana; <i>a</i> , isotermas de compresión para distintas presiones iniciales de lípido antes de la inyección de EME; <i>b</i> , variación de la presión al inyectar el extracto de membrana bajo la monocapa de POPC; <i>c</i> , variación del módulo de compresión para las distintas presiones iniciales de la monocapa frente a la presión de compresión; <i>d</i> , variación del módulo de compresión de la monocapa en función de la presión inicial de inserción para bajas (20 mn/m), medias (30 mn/m) y altas (40 mn/m) presiones de monocapa.....	171
figura 6.3-6: Representación esquemática del proceso de inserción del extracto en la monocapa de POPC en función de la presión inicial, tanto en ausencia como presencia de ATP.	172
figura 6.3-7: Resultados obtenidos al realizar las isotermas de compresión, siendo la presión de inserción del extracto de membrana de eritrocito 5 mn/m, para distintas concentraciones de ATP. <i>A</i> , isotermas de compresión de las monocapas, en las que se observa un aumento de la presión superficial de membrana al realizar la inyección bajo monocapa del EME; <i>b</i> , relación de la variación de presión superficial en función de la concentración de ATP, donde se observa una tendencia a la compactación de la monocapa a mayores concentraciones de ATP; <i>c</i> , comportamiento del módulo elástico de compresión en función de la concentración de ATP, siendo en rojo a bajas presiones (20 mn/m), azul presiones medias (30 mn/m) y negro altas presiones (40 mn/m) de la monocapa. La línea punteada indica la tendencia esperada hacia la rigidificación de la monocapa a mayores concentraciones de ATP, mostrando un comportamiento de fluidificación activa de la monocapa.	173
figura 6.3-8: Medida del módulo dinámico de elasticidad ($\epsilon'(\omega)$ con símbolos rellenos) y la pérdida de viscosidad ($\epsilon''(\omega)$ símbolos huecos) medidos en función de la frecuencia (ω) en experimentos con barrera oscilatoria con monocapas de POPC en medio tamponado con 5 mM ATP en ausencia de EME (●) y en presencia de EME (■). La línea punteada en horizontal corresponde al módulo de compresión de equilibrio (ϵ_0).	174
figura 6.3-9 Esquema de las distintas fases Ld, y Ld + 3D. Ésta última presenta dos tipos esquemáticos según la proximidad a la zona de inestabilidad (más inestable Ld + 3D*)......	176
figura 6.3-10: Diagramas de fases estudiados con imágenes características de las zonas del mismo: (a) diagrama de fases con 0% chol, (b) diagrama de fases con 15% chol, (c) diagrama de fases con 30%, (d) diagrama de fases con 40%, (e) diagrama de fases con 50%. En cada uno se muestran las imágenes más representativas de las zonas observadas.....	178
figura 6.3-11 En esta imagen se observa la evolución de la zona de composición fisiológica según la proporción de colesterol.	179
figura 6.3-12: Variación del porcentaje en colesterol frente a la composición de PE. En él se representan las dos líneas de tendencia, tanto lineal como parabólica. La zona sombreada en gris representa el intervalo característico de la composición fisiológica.	179
figura 6.3-13: Dibujo esquemático de una monocapa con distintas composiciones de lípidos. Abajo a la derecha se encuentra representada la repulsión estérica del PE-chol.....	180
figura 6.3-14: Imágenes de dos experimentos distintos (<i>a</i> , <i>b</i> y <i>c</i> son parte del mismo experimento y <i>d</i> es distinto, ya que las sondas FM-143 y Rh-PE emiten en el mismo canal) marcados con las distintas sondas fluorescentes para comprobar si los filamentos internos están conectados con la membrana externa de las GUVs. <i>a</i> . Imagen en campo claro; <i>b</i> . Imagen de una vesícula marcada con la sonda lipofílica FM-143 (no es capaz de atravesar la membrana, por lo que si existieran filamentos conectados de la membrana externa hacia el interior se vería algo); <i>c</i> . Imagen de una	

vesícula marcada con la sonda fluorescente NBD-PC; d. Imagen de una vesícula marcada fluorescentemente con Rh-PE.	181
figura 6.3-15: Imágenes tomadas bajo el mismo método de electroformación de lípidos sintéticos (a) en ausencia de proteína (EME) y (b) en presencia de proteína (EME).	182
figura 6.3-16: En la imagen a, se observan vesículas con extracto de membrana de eritrocito en presencia de la disolución tamponada. A su derecha, b, la imagen de una vesícula con extracto de RBC en presencia de ATP 2 mM. esta imagen está hecha mediante tomografía a lo largo del eje Z, de mezcla lipídica artificial en un 80% y el 20% restante es extracto de glóbulo rojo. La espectrina en presencia de ATP polimeriza, pero no forma las redes características entrecruzadas del glóbulo rojo debido a que hay mayor cantidad de lípido que de proteína; en c se muestra una toma de la base de la vesícula en b, donde se observa la espectrina polimerizada.	183
figura 6.3-17 Diagrama de fases al 30% en colesterol y con un 20% de extracto de RBC con las correspondientes imágenes características de cada zona.	184
figura 6.3-18: Variación del porcentaje en colesterol frente a la composición de PE. La zona sombreada en gris representa el intervalo característico de la composición fisiológica, viéndose aumentada la estabilidad en presencia del eme aportando una red de citoesqueleto parcial.	185
figura 6.3-19: Imagen tomada de uno de los vídeos empleados para obtener el módulo de bending y tensión lateral de la membrana, compuesto por mezcla de lípido sintético al 80% y 20% de EME.	185
figura 6.3-20: Espectro de fluctuaciones para el <i>eme</i> tanto en presencia como ausencia de ATP y espectro de fluctuaciones de la mezcla de lípido sintético con el 20% de EME. Se observa que en ausencia de ATP hay un residuo con un valor aproximado de 2×10^{-6} , igual ocurre con la mezcla de lípido y EME al 20% que queda un residuo de un orden de magnitud inferior. El régimen de tensión está dominado por q^{-3} y el de tensión por q^{-1}	186
figura 6.3-21: Promedio de las constantes obtenidas, representadas en la tabla 6.3-1, de los experimentos realizados con su error correspondiente. A la izquierda los valores correspondientes al módulo de bending (κ) y a la derecha los correspondientes a la tensión lateral de la membrana (σ) para los distintos escenarios lipídicos.	187

Listado de Tablas

Tabla 3.5-1: Tabla sinóptica de los tipos de liposomas en función de tamaño y número de lamelas.	91
Tabla 6.3-1: Resultados obtenidos para los distintos sistemas estudiados en la presente tesis y resultados obtenidos de la bibliografía o cedidos, de los valores del módulo de <i>bending</i> y tensión de membrana, tanto en ausencia como presencia de ATP.....	187

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Descripción
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
Å	Angstrom
A/W	Interfase aire – agua
ADP	Adenosín difosfato
AJ	Adherent Junctions = Uniones adherentes
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CAM	Cell Adhesion Molecules – moléculas de adhesión celular
C-cadherina	Cadherina clásica
Chol	Colesterol
Cis	Asociación lateral entre proteínas de la misma célula o liposoma
CryoTEM	Criomicroscopía de transmisión electrónica
Ct	Carbono terminal de una proteína
C_α	Carbono alfa de un aminoácido
Da/D	Dalton
DODA	Bromuro de dioctadecildimetilamonio
DOGS-NTA	Sal de níquel 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[(ácido N-(5-amino-1-carboxipentil)iminodiacético- succinil]
DOPC	1,2-dioleil-sn-glicero-3-posfatidilcolina
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-2-fosfatidiletanolamina
EC	Ectodominio
E-cadherin	Cadherina epitelial
EDTA	Ácdo etilendiaminotiracético
EME	Erythroid Membrane Extract – Extracto de membrana de glóbulo rojo
F –	Fibrilar
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
G –	Globular
GUV	Giant Unilamellar Vesicles – vesícula unilamelar gigante
His-Tag	Cadena de 6 histidinas unidas al carbono terminal del ectodominio
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
ITO	Indium Tin Oxide
LC	líquido expandido
Ld	Fase uniforme

Abreviaturas

LE	líquido comprimido
Lip-NHS	3-(N-succinimidiloxiglutaril)aminopropil, polietileneglicolcarbamil dies-tearoilfosfatidil-etanolamina
LUV	Large Unilamellar Vesicles – vesícula unilamelar grande
NBD-PC	
N-cadherina	Cadherina neuronal
NHS	Succinimida
Ni-NTA	Ácido nitrilotriacético quelado a níquel (II)
Nt	Nitrógeno terminal de una proteína
NTA	Ácido nitrilotriacético (agente quelante)
PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida
PBS	Phosphate buffer saline – tampon salino fosfato
PC	Phosphatidylcholine
PDB	Protein Data Bank
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polyethilenglycol
POPC	1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-posfatidilcolina
POPS	1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-posfatidilserina
PS	Fosfatidilserina
RBC	Red Blood Cell – Glóbulo Rojo o Eritrocito
Rh-PE	Rhodamina PE
SDS	Dodecilsulfato sódico
SUV	Small Unilamellar Vesicles – vesícula unilamelar pequeña
Trans	Asociación entre dos células vecinas o liposomas
Trp	Triptófano

Lista de símbolos

Símbolos	Descripción
$\tilde{\lambda}$	Variación de extensión lateral
A	Área de la molécula
A^*	Tamaño de la zona adhesiva
a_0	Área óptima de cabeza
D	Diámetro
ds_i	Distancia curvilínea
f	Flexión de membrana
\mathcal{F}	Hamiltoniano de Canham-Helfrich
Fa	Energía de adhesión
F_{adh}	Fuerza de adhesión
\mathcal{F}_{ciz}	Energía de cizalla
\mathcal{F}_{curv}	Energía de curvatura
\mathcal{F}_{ext}	Energía de extensión-compresión
F_k	Energía de curvatura
\mathcal{F}_{tens}	Energía elástica
G	Energía libre de Gibbs
G'	Módulo de almacenamiento
G''	Módulo de pérdidas
G_{adh}	Energía de adhesión
G^s	Energía libre superficial
H	Curvatura media
h	Altura del depósito de agua
I	Intensidad
k_B	Constante de Boltzmann
L	Longitud del contorno
L	Longitud del contacto adhesivo
l_c	Longitud de cadena lipídica
L_d	Fase líquido desordenado
L_0	Fase líquido ordenado
L_α	Fase líquido cristalino
L_β	Fase lamelar con cadenas hidrocarbonadas perpendiculares al plano
$L_{\beta'}$	Fase lamelar con cadenas hidrocarbonadas inclinadas
$L_{\beta I}$	Fase lamelar con cadenas hidrocarbonadas interdigitadas

Símbolos

M_w	Peso molecular
P	Presión
$P_{\beta'}$	Fase lamelar con estructura ondulada
Q	Vector de onda
R	Radio
R	Vector de posición
S	Parámetro de forma
S	Superficie de membrana
s	Longitud de contorno
S_o	Sólido ordenado
T	Temperatura
t	Tiempo
T	Periodo de deformación
Tm	Temperatura de fusión
v	Volumen de lípido
V	Volumen
W	Potencial de contacto
X	Fracción molar
γ	Tensión superficial
Γ	Frecuencia de relajación
$\Delta\alpha$	Área en exceso
$\delta\zeta$	Variación diferencial de la altura en fluctuaciones
ε	Módulo de compresibilidad
ζ	Amplitud de fluctuaciones
η	Viscosidad
κ	Módulo de curvatura
κ_G	Módulo de curvatura gaussiana
μ	Módulo de cizalla
μ	Viscosidad superficial de cizalla
ξ	Longitud de correlación
π	Presión superficial
σ	tensión
ϕ	Ángulo local de contacto
ψ	Ángulo de contacto
ω	Fuerza a escala del potencial de adhesión
ω	Velocidad angular

Parte I:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN

Célula (Del lat. *cellŭla*, dim. de *cella*, hueco).

I. f. Biol. Unidad fundamental de los organismos vivos, generalmente de tamaño microscópico, capaz de reproducción independiente y formada por un citoplasma y un núcleo rodeados por una membrana. [*l. Diccionario de la Real Academia Española*]

Biología Molecular

Parte de la biología que estudia los procesos vitales de los seres vivos en función de las características de su estructura molecular.

1.1 LA MEMBRANA CELULAR

Las **membranas celulares** son cruciales para la vida celular, envuelven la célula, definiendo sus límites y estructura, y manteniendo las distancias y conexiones esenciales entre su contenido y el entorno. Dentro de la célula eucariota, las membranas del retículo endoplasmático, el complejo de Golgi, las mitocondrias y otros orgánulos delimitados por membranas, mantienen diferencias características entre el contenido de cada uno de ellos y el citosol y sus funciones biológicas con objetivo de aislar procesos, organizar secuencias de complejas reacciones, como la síntesis de lípidos, y participar en la comunicación intercelular. Los gradientes iónicos que se establecen a través de las membranas, generados por la actividad de proteínas de membrana especializadas, pueden utilizarse para sintetizar ATP, dirigir el movimiento transmembrana de determinados solutos o, en células nerviosas y musculares, producir y transmitir señales eléctricas. En todas las células la membrana plasmática contiene también proteínas que actúan como sensores de señales externas, permitiendo que la célula cambie su comportamiento en respuesta a indicaciones ambientales; estas proteínas sensores, o receptores, no transfieren iones ni moléculas sino la información a través de la membrana, la cual emerge de nuevo como el elemento esencial para la comunicación, en este caso, intercelular (1).

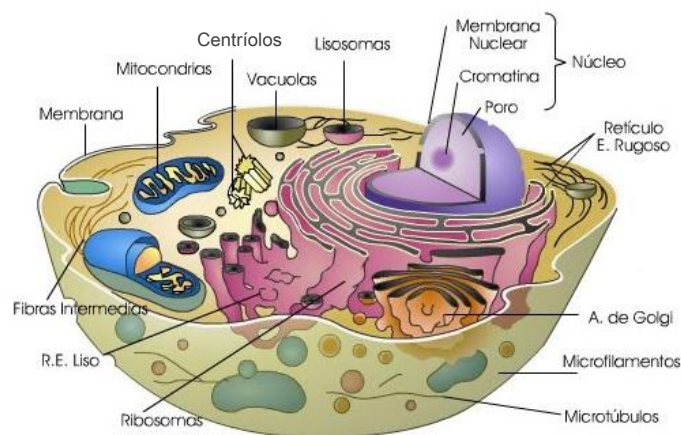


Figura 1-1-1: Ilustración de los componentes de una célula eucariota (Extraída de proyecto biosfera, MEC)

El espesor de la membrana celular que separa el contenido del medio interno con el exterior, es muy fina, mide entre 5-10 *nm* de espesor. Debido a su pequeño tamaño, cuando una célula se examina en un microscopio óptico no se obtiene ningún indicio de membrana celular. Es por esto que hasta finales de los años 50, que las técnicas de preparación y tinción de tejidos progresaron hasta el punto de ser capaces de observar la membrana plasmática con un microscopio electrónico. Las micrografías electrónicas, tomadas por J.D. Robertson de la Duke University, mostraban que la membrana plasmática tiene una estructura distribuida en tres capas que consistía en dos capas oscuras, la interior y la exterior, y una capa clara entre las oscuras. Todas las membranas celulares que se estudiaron, ya fuera la membrana plasmática, nuclear, tomada de plantas, animales o microorganismos, presentaba el mismo tipo de estructura. Es por ello que a partir de estas micrografías electrónicas se generó un gran debate sobre la composición de las distintas capas de la membrana (2).

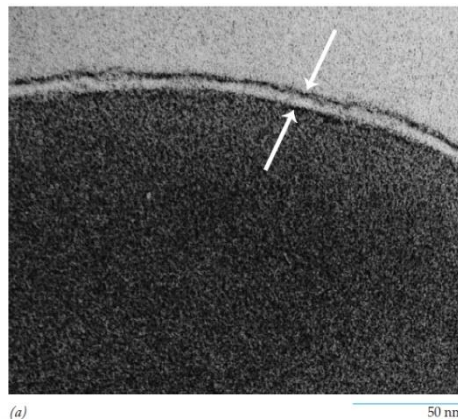


Figura 1-1-2: Microfotografía electrónica de una membrana celular (2)

Las **membranas celulares** de todos los organismos vivos presentan un aspecto muy similar en el microscopio electrónico pese a las distintas funciones biológicas que poseen. Estas capas oscuras son una fina capa constituida por lípidos, organizados en bicapas, y proteínas, que se mantiene unida, principalmente, por interacciones no covalentes. Las membranas celulares son estructuras dinámicas, fluidas cuyas moléculas tienen capacidad de desplazarse en el plano de la membrana.

1.1.1. Breve historia de los estudios de la membrana celular

Los primeros en proponer que la membrana celular podría llegar a estar compuesta por una bicapa lipídica fueron E. Gorter y F. Grendel en 1925. Estos científicos midieron la cantidad de lípido que era necesaria para rodear la célula cuando se expandía sobre una superficie acuosa (Figura 1-1-3a). Observaron que la relación del área superficial del agua cubierta por el extracto de lípido de la membrana respecto al área superficial calculada del glóbulo rojo era entre 1.8 y 2 veces mayor, es decir, se podría decir que la relación era 2:1, concluyendo que la membrana celular contenía una bicapa de lípidos (3). También especularon sobre una disposición termodinámicamente favorable de los grupos polares de las cabezas lipídicas y las cadenas de ácidos grasos (4; 5).

En 1935, Hugh Davson y James Danielli propusieron un nuevo modelo de membrana denominado “*modelo tipo sándwich*” (Figura 1-1-3b). Este modelo proponía que la membrana celular estaba compuesta por una bicapa de lípidos pero, tanto en la capa interna como externa de la bicapa, estaba recubierta por una capa de proteínas globulares (Figura 1-1-3c). En 1957, modificaron el modelo propuesto por Davson y Danielli, con estudios realizados con microscopía electrónica (6), y se propuso el modelo llamado “*Membrana Unidad*”. Esto condujo a un nuevo concepto de estructura de membrana, y en 1972, S. Jonathan Singer y Garth Nicolson propusieron el “*Modelo del Mosaico Fluido*” (Figura 1-1-3d) (7).

El *Modelo del Mosaico Fluido* (MMF) expone que la membrana celular está formada por un “mar de lípidos”, que es la bicapa lipídica, en estado fluido, donde las moléculas de lípido se pueden mover lateralmente en el plano de la membrana. La disposición de las proteínas en este modelo es distinta a como se había propuesto en modelos anteriores, en el MMF las proteínas globulares integrales de membrana y las glucoproteínas, se encuentran embebidas en la bicapa de lípidos de forma discontinua, a modo de mosaico, y presentan movilidad lateral (2). El factor más importante de éste modelo es que las membranas celulares se presentan como estructuras dinámicas cuyos componentes principales son capaces de interactuar en distintos tipos de reacciones transitorias. El MMF es de los modelos de membrana más citados y reconocidos, fue aceptado como el modelo que lo “encaja todo”, para cada membrana celular bajo cualquier condición. Pero, tras más de 20 años, el MMF no era válido para cualquier tipo de estructura de membrana celular, especialmente para los recientemente descubiertos “Rafts lipídicos” o “balsas lipídicas”, ni podía explicar la dinámica de todos los componentes de la membrana (8; 9; 10) (Figura 1-1-3e).

Capítulo 1

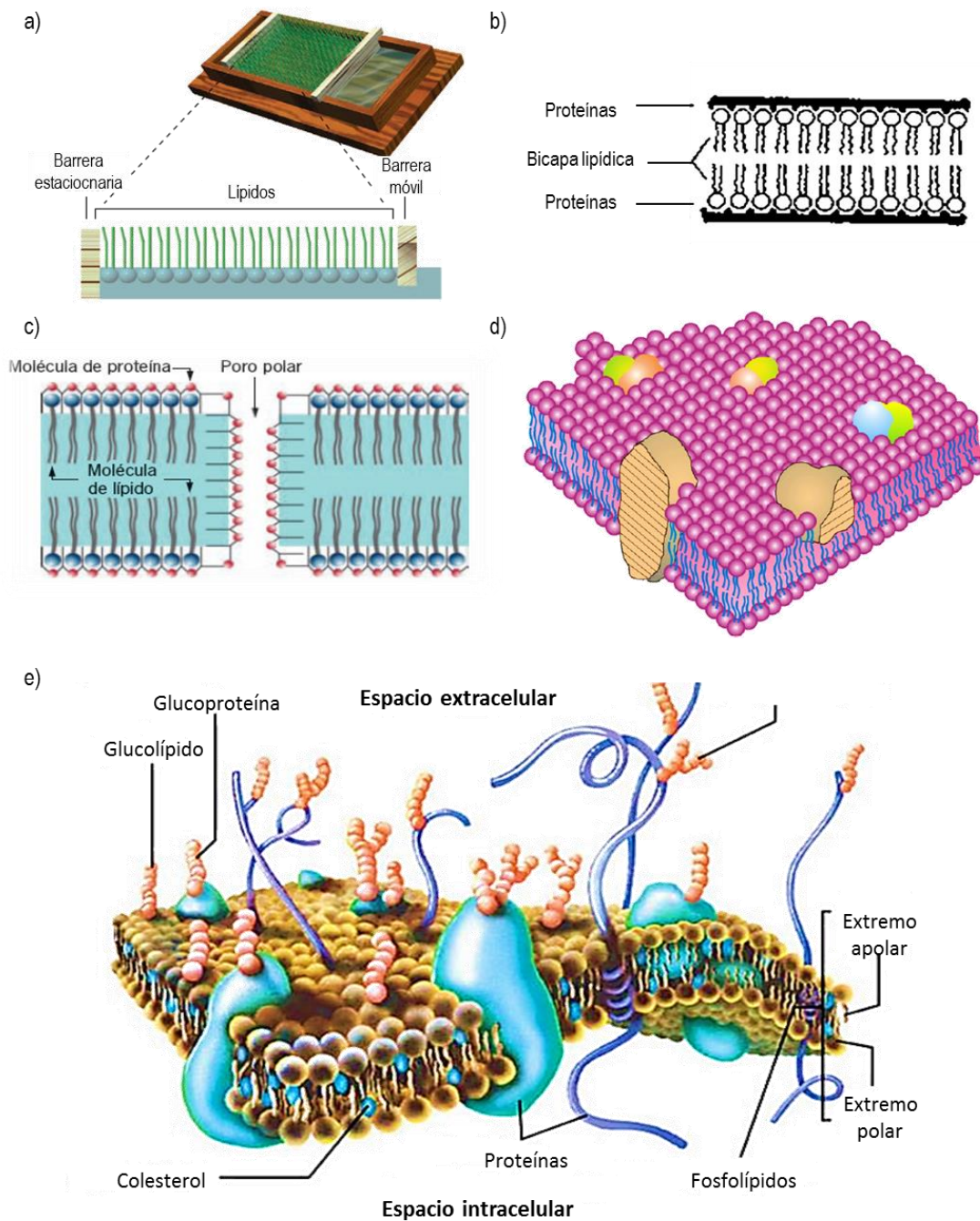


FIGURA 1-1-3: Breve historia de los modelos de las estructuras moleculares. a) Estudio realizado por Gorter y Gren-
del empleando una balanza de Langmuir, para medir la cantidad de lípido que era necesario para rodear la célula al
expandirse sobre una superficie acuosa, concluyendo que las membranas de los glóbulos rojos contienen el sufi-
ciente lípido para formar una bicapa lipídica. b) En 1935, Daveson y Danielli propusieron el modelo "tipo sándwich"
formado por una bicapa de lípidos rodeada de proteínas globulares, más adelante, en 1954, mostraron una nueva
versión del modelo, mostrando en la bicapa lipídica poros formados por una capa monomolecular de proteínas (c).
d) Estructura del modelo del Mosaico Fluido de Singer y Nicolson en 1972 propuesto inicialmente. Al contrario que
los modelos estructurales anteriores, en este modelo de membrana las proteínas se encuentran insertadas en la
bicapa. e) Representación actual de la membrana plasmática donde se muestra la misma organización básica pro-
puesta por Singer y Nicolson. En la superficie externa de la mayoría de las proteínas, y de algunos fosfolípidos, con-
tiene cadenas de oligosacáridos, formando glucoproteínas o glucolípidos. Las dos monocapas de la membrana
contienen lípidos distintos en distinta proporción y la membrana externa contiene los "rafts" lipídicos que consisten
en agrupaciones de especies lipídicas específicas. (11; 2; 12).

1.1.2. Estructura de la membrana lipídica

Hoy en día se sabe que los lípidos de membrana tienen propiedades especiales que les permiten formar estructuras de doble capa, y que estas estructuras permiten la integración de membranas biológicas.

Las moléculas anfipáticas, y en particular los lípidos, juegan un papel vital, desde la formación de estructuras de membrana hasta la estabilización de proteínas globulares o la formación de orgánulos complejos. En términos de estructura química, las moléculas anfipáticas tienen grupos hidrofóbicos alquílicos o aromáticos combinados con grupos polares y/o iónicos con carácter hidrofílico. La necesidad de minimizar la energía del sistema es lo que conduce a la formación de estructuras agregadas como micelas o al fenómeno de la adsorción en interfases con formación de monocapas, bicapas, estructuras vesiculares y, por supuesto, a la existencia de membranas biológicas.

La estabilidad de las membranas biológicas y los sistemas funcionales asociados con ellas dependen de la naturaleza anfipática de sus componentes, específicamente de los lípidos de membrana, proteínas y glucoproteínas. En lo que respecta a las propiedades de equilibrio y mecánicas de las membranas, son los lípidos los que juegan un papel más importante, mientras que las proteínas son las que exhiben funcionalidades biológicas específicas.

La membrana celular no sólo está compuesta de lípidos. Las proteínas de membrana se hallan “disueltas” en la bicapa lipídica mediando la mayoría de funciones como el transporte de moléculas específicas a través de ellas, puntos de anclaje de otras proteínas que relacionan la membrana con el citoesqueleto y/o matriz extracelular de otras células adyacentes, mientras que otras reciben y transducen señales químicas procedentes del entorno celular. *Debido a la diversidad de funciones que desempeñan es de esperar que la distribución lipídica y proteica de sus caras interna y externa sea diferente, aportando así la propiedad de asimetría de membrana.*

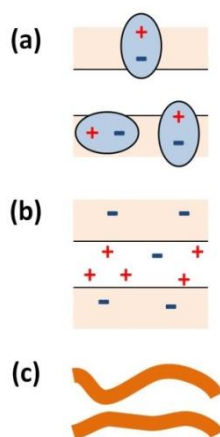


FIGURA 1-1-4: Contribuciones a la fuerza intermembrana: (a) atracción de Van der Waals entre dipolos eléctricos, (b) repulsión electrostática entre bicapas cargadas y (c) repulsión entrópica entre membranas fluctuando. (14)

Las membranas biológicas son estables debido a la participación de distintas fuerzas de interacción entre las moléculas que la componen. Para separaciones del orden de 5 nm o más, las fuerzas de unión que contribuyen son las fuerzas de polarizabilidad molecular de Van der Waals, y las fuerzas electrostáticas procedentes de las superficies cargadas. A distancias más cortas existe el conflicto estérico entre la matriz extracelular de cada membrana junto con la fuerza intermembrana, la cual se ve incrementada por el esfuerzo necesario para expulsar la solución adyacente a las bicapas. Además, la propia membrana experimenta unas fluctuaciones térmicas suaves, las cuales aportan una resistencia entrópica frente a la adhesión de membrana incluso a distancias de pocos nanómetros.

1.1.3. Integrantes de la membrana celular

Todas las biomembranas tienen la misma estructura básica de bicapa fosfolipídica y ciertas funciones comunes, cada tipo de membrana celular también tiene ciertas actividades distintivas determinadas por el exclusivo grupo de proteínas relacionadas con esa membrana.

Todas las membranas tienen una naturaleza anfipática, es decir, tienen una capa central hidrofóbica (no polar) entre dos superficies hidrofílicas (polares), y las moléculas y macromoléculas que constituyen esas membranas están diseñadas para conformar y mantener una estructura básica. La unidad básica de la membrana tiene un espesor de unos 5-8 nm. Las membranas biológicas tienen tres compuestos principales: lípidos, proteínas y carbohidratos. Debido a que las proteínas, podría decirse que son polímeros de aminoácidos, su polaridad depende de la composición de aminoácidos, por lo que están compuestos de dominios hidrofóbicos ricos en residuos no polares en la cadena, y dominios hidrofílicos que, por lo general, rodean a los hidrofóbicos.

Los lípidos se podrían considerar hidrofóbicos, ya que éstos son solubles en disolventes orgánicos pero poco solubles en agua. Debido a que los lípidos son anfifílicos, cuando se encuentran en sistemas acuosos agregan espontáneamente, formando estructuras con dominios polares y no polares. De este modo, cuando se mezcla un lípido puro con agua, dependiendo de la naturaleza del lípido y el método de preparación, da lugar a la formación de monocapas, micelas, bicapas, estructuras hexagonales o fases cúbicas. Los lípidos que componen las membranas celulares presentan una estructura compuesta por una molécula (“cabeza”) polar y una cola hidrofóbica. Éstos son capaces de ensamblarse formando estructuras esféricas de tal modo que las cabezas polares quedan expuestas a un medio acuoso y las colas hidrofóbicas quedan distribuidas en una disposición minimizando así su contacto con el medio. Este tipo de conformaciones suelen ser en estructura de bicapas cerradas confinando un medio hidrofílico en el interior. Esta bicapa de lípidos ejerce de estructura básica y barrera relativamente impermeable al paso de la mayoría de moléculas hidrosolubles.

La bicapa lipídica ha sido claramente establecida como la base universal de la estructura de la membrana celular. Es fácil de observar con el microscopio electrónico, aunque para revelar los detalles de su organización son necesarias técnicas especializadas, como la difracción de rayos X y la criofractura. La bicapa lipídica es permeable a pequeñas moléculas no ionizadas como el glicerol, la urea, el agua, el oxígeno y el dióxido de carbono y a todas las moléculas lipofílicas. También proporciona un marco estructural y un entorno apropiado para el funcionamiento de muchas proteínas de membrana.

1.1.3.1. Lípidos de membrana

Para conocer las membranas biológicas, y en particular, predecir su comportamiento, se requiere un gran conocimiento acerca de sus componentes. Los lípidos que forman la membrana biológica no solo son el “mar” en el que se encuentran flotando las proteínas de membrana. Una membrana biológica contiene más de un centenar de especies lipídicas, las cuales varían su estructura principalmente debido a la longitud de la cadena acíclica. Las bicapas celulares se basan principalmente en una variedad molecular de fosfolípidos que poseen dos cadenas hidrocarbonadas.

Los componentes lipídicos de una biomembrana se dividen en glicerofosfolípidos o fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. Los fosfolípidos son los componentes mayoritarios de las membranas biológicas y representan más del 50% en masa de los lípidos de membrana.

Los *fosfolípidos* que constituyen la bicapa lipídica, a diferencia de los ácidos grasos, están constituidos principalmente por dos cadenas acíclicas ancladas a un grupo glicerol, el cual está unido a la cabeza polar mediante un enlace fosfato (PO_4^-) (Figura 1-1-5). Los principales grupos polares de los fosfolípidos que se encuentran en las membranas biológicas son la colina, etanolamina, glicerol y serina (Figura 1-1-5, abajo). La mayoría de los fosfolípidos que se encuentran en una biomembrana, una de las cadenas hidrocarbonadas poseen una cadena formada por enlaces simples $\text{C}-\text{C}$, mientras que la otra cadena posee un doble enlace $\text{C}=\text{C}$. La cadena formada por enlaces simples $\text{C}-\text{C}$ tiene libertad de giro aportando así un gran número de conformaciones, sin embargo, cuando se encuentra en una estructura lamelar, esta cadena tiende a enderezarse debido a las interacciones estéricas con los lípidos circundantes. Al contrario, el doble enlace genera un pliegue permanente en la otra cadena hidrocarbonada, dificultando la formación de un empaquetamiento compacto y reduciendo la viscosidad del plano de la bicapa. Otros lípidos, como el colesterol se adaptan a estos pliegues formados por las insaturaciones.

Una segunda clase de lípidos que constituyen la membrana, pero menos abundantes, son los *esfingolípidos*. Son derivados de la esfingosina que es un aminoalcohol con una única cadena acíclica, que a través de su grupo amino puede dar lugar a diversos lípidos: si está unida a una cadena acíclica da lugar a la ceramida; si en lugar de una cadena acíclica es una fosforilcolina la molécula que se forma es la esfingomielina, que es el único fosfolípido de membrana que no está construido sobre una estructura de glicerol. Cuando la sustitución es de azúcares u oligosacáridos, da lugar a una gran variedad de cerebrosidos, si está unido a monosacáridos, y gangliósidos, si está unido a oligosacáridos. Los esfingolípidos son componentes importantes en las membranas de células neuronales y poseen un papel fundamental en los procesos de diferenciación y reconocimiento celular.

Capítulo 1

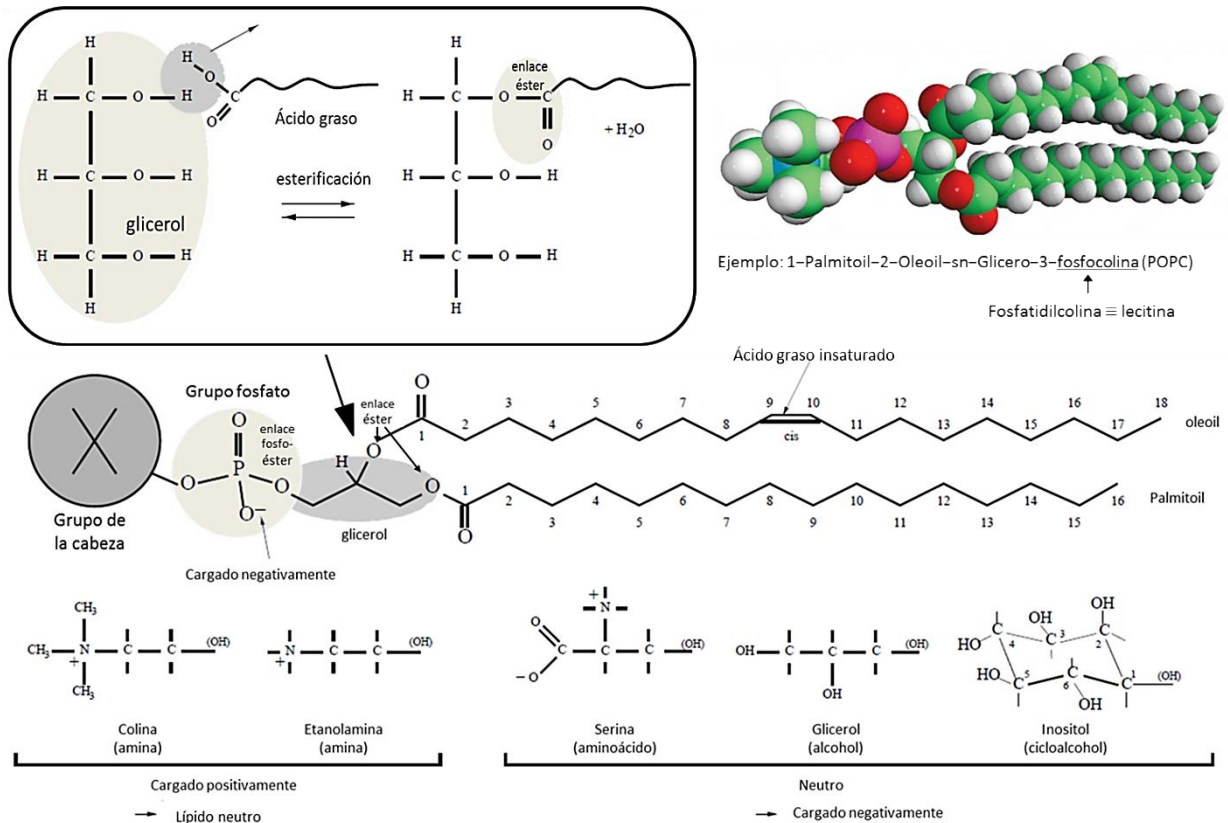


FIGURA 1-1-5: Imagen adaptada de "fluid lipid membranes – a premier" de Markus Deserno (13). Arriba izquierda, reacción de esterificación de una cadena hidrocarbonada con una molécula de glicerol para formar un ácido graso; derecha, dibujo esquemático de la estructura atómica de una molécula de fosfolípido genérica. Abajo, esquema detallado de un fosfolípido, donde se observan las partes fundamentales como son la cola hidrofóbica, formada por las dos cadenas acílicas, saturada e insaturada, y la cabeza hidrofílica con sus tres componentes principales, el grupo glicerol, el grupo fosfato y el grupo de la cabeza que dará la funcionalidad a la molécula.

El *colesterol* y sus derivados constituyen la tercera clase abundante de lípidos en las membranas, los esteroides. La estructura básica de los esteroides es de cuatro anillos hidrocarbonados. El colesterol, que es el principal esteroide de los tejidos animales, siendo el más abundante en las membranas de eritrocitos, otras membranas plasmáticas y en varios compartimentos subcelulares de eucariotas, siendo del 30-50% del total de fracción lipídica. Tiene un hidroxilo en uno de los anillos pudiendo interactuar con el agua, dándole propiedades anfipáticas. El colesterol y otros esteroides son demasiado hidrófobos como para formar una bicapa, y es por ello que se mezclan con los fosfolípidos. Al interactuar con otros lípidos de membrana, impone un orden conformacional a los lípidos vecinos (14). Debido a su estructura rígida, formada por un tetraciclo, se puede alinear mejor con las cadenas acílicas saturadas, teniendo preferencia hacia la esfingomielina y fosfolípidos saturados frente a sus homólogos insaturados. Esta interacción interfiere con la flexibilidad de las cadenas acílicas de los lípidos rigidificando la bicapa mientras que ésta mantiene su fluidez general pero disminuyendo la velocidad de difusión de los fosfolípidos en la membrana. El ergosterol y lanosterol son otros dos representantes de la clase de esteroides y presentan una estructura similar al colesterol. El ergosterol se encuentra en las membranas de los hongos, levaduras y protozoos, mientras que el lanosterol es el esteroide de los procariotas y el precursor del colesterol y ergosterol (15).

Aunque las biomembranas no estén compuestas por un solo tipo de lípido, es posible producir y estudiar membranas de lípido puro en un laboratorio. El rango de longitud de cadena para lípidos de membrana se centra entre 15—18 átomos de carbono, dándonos así una idea de las condiciones de concentración lipídica y temperatura que debe tener una biomembrana para ser estable. Si la longitud de la cadena es corta, los lípidos no formarán bicapas a bajas concentraciones, mientras que si la cadena es muy larga, la bicapa será muy viscosa y la difusión lateral de las moléculas se verá impedida.

La forma de la membrana lipídica depende del área efectiva de la cabeza polar de los lípidos frente al volumen de la parte hidrofóbica. Los lípidos de membrana tienen predisposición a la forma cilíndrica (fosfatidilcolina, fosfatidilserina), a la forma cónica (fosfatidiletanolamina) o a la forma de cono invertido (lisofosfatidilcolina). Debido a este polimorfismo, los lípidos de membrana están influenciados para localizarse en las membranas biológicas.

1.1.3.2. *Proteínas de membrana*

Según el tipo de célula y el orgánulo particular del interior de dicha célula, una membrana puede contener desde una docena hasta más de 50 proteínas diferentes. Estas proteínas no se disponen al azar dentro de la membrana, sino que cada una se localiza y orienta en una posición particular respecto a la bicapa de lípidos. Todas se sitúan asimétricamente de modo que las propiedades de la porción externa de la membrana son muy distintas a las de la porción interna. Como resultado de esta “lateralidad” de la membrana, las proteínas situadas en la monocapa externa de la membrana, interactúan con otras células o con ligandos extracelulares, como hormonas o factores de crecimiento, mientras que las proteínas de las partes de la membrana que interactúan con moléculas citoplasmáticas se enfrentan al interior de la célula. Las proteínas de la membrana se pueden agrupar en tres tipos:

1. *Proteínas integrales de membrana*, que penetran en la bicapa de lípidos. Son anfipáticas y presentan porciones hidrófilas e hidrófobas. Contienen residuos no polares en gran parte de su superficie expuesta que se integran en la bicapa lipídica, donde pueden sufrir interacciones hidrofóbicas con las cadenas acílicas. El resto de una proteína integral se compone principalmente de aminoácidos iónicos y polares no integrados que sobresalen del borde de la bicapa, en uno o ambos lados, o forman un canal acuoso a través de la misma.

2. *Proteínas periféricas*. Se localizan por completo sobre la superficie extracelular o citoplasmática, pero relacionadas con la superficie de la membrana mediante enlaces electrostáticos, ya sean con grupos hidrófilos a la cabeza polar de los lípidos o a porciones hidrófilas de las proteínas integrales que sobresalen de la bicapa. Algunas de estas proteínas forman parte de una red fibrilar que actúa como esqueleto flexible que suministra apoyo mecánico a la membrana cuando se producen cambios rápidos en la morfología celular y fija a las proteínas integrales de membrana. Otras proteínas periféricas expuestas a la superficie interna de la membrana funcionan como enzimas o factores transmisores de señales a través de la membrana.

Capítulo 1

3. *Proteínas ancladas a lípidos*, están localizadas fuera de la bicapa, pero se unen mediante enlaces covalentes a una molécula de lípido situada dentro de la bicapa.

PROPIEDADES DE TRANSPORTE DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Una de las propiedades importantes de las proteínas de membrana es el transporte a través de la misma. Existen diferentes tipos de transporte a través de la membrana plasmática: el *transporte pasivo*, en el que las moléculas se desplazan espontáneamente a través de la membrana a favor del gradiente de concentración, no requiere energía. Puede ser por difusión simple o difusión facilitada por proteínas transportadoras. El otro tipo de transporte es el *transporte activo*, el cual ocurre contra gradiente y con gasto energético. Se realiza mediante proteínas transportadoras (carriers o permeasas).

Como consecuencia a esto se sabe que las biomembranas son selectivamente permeables, es decir, sólo pueden pasar moléculas disueltas si están presentes sus transportadores específicos, los cuales son proteínas que reconocen las moléculas y pueden llevarlas a través de la membrana incluso a contra de gradiente.

Otra propiedad de las biomembranas es que no surgen *de novo*, sino que se generan a partir de otras existentes y crecen incorporando nuevas moléculas de lípidos y proteínas sintetizadas, y aportadas, desde el retículo endoplasmático.

1.1.4. Ensamblaje lipídico: Termodinámica de las bicapas lipídicas

Las estructuras que forman los agregados lipídicos espontáneamente en medio acuoso, está condicionada por la forma característica de los lípidos constituyentes. Existen tres categorías generales de fases lipídicas: fase lamelar, hexagonal y cúbica. Las fases lamelares más comunes son la $L\alpha$, a la que también se denomina líquido cristalino o desordenado (L_d); la fase $L\beta$, o fase gel y la fase S_o o sólido ordenado.

Cambios en la composición lipídica y en la temperatura dan lugar a cambios de fase. Lo que determina que un lípido tienda a formar una fase lamelar o hexagonal bajo determinadas circunstancias se debe a la hipótesis de formas (Figura 1-1-6), la cual sugiere que los agregados formados por fosfolípidos puros en dispersiones acuosas reflejan, en general, la forma de las moléculas individuales.

Israelachvili definió el parámetro de forma, S , como un parámetro de empaquetamiento adimensional, que determina el empaquetamiento óptimo que debe tener la estructura del agregado para que éste sea entrópicamente favorable y presente una energía libre mínima:

$$(1-1) \quad S = \frac{v}{a_0 \cdot l_c}$$

Donde v es el volumen de lípido, a_0 el área óptima de la cabeza y l_c la longitud de la cadena de lípido. Para lípidos prácticamente cilíndricos, $S \approx 1$, como los fosfolípidos, tienden a agregar en forma de bicapas, es decir, para valores aproximados de a_0 y l_c , el volumen debe ser al menos el doble que el que tiene tendencia a formar micelas, es decir, los fosfolípidos formadores de bicapas son aquellos que tienen dos cadenas acílicas.

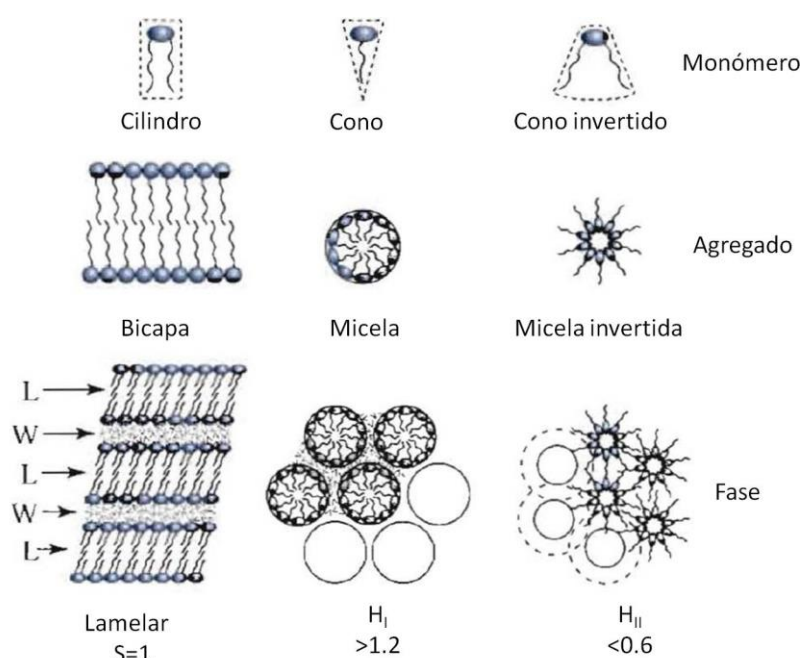


Figura 1-1-6: Hipótesis de formas. Relación estructural entre la forma del lípido como monómero y los agregados, lo cual influye en el polimorfismo lipídico. El parámetro de forma, S , es la relación entre el volumen y el área de la cabeza polar y la longitud de cadena. Cuando $S \approx 1$, el lípido tiene una forma cilíndrica y en medio acuoso puede formar bicapas estables (fase lamelar). Cuando $S > 1$, el lípido tiende a agregarse formando micelas (fase H_I) y cuando $S < 1$, tiende a formar micelas inversas (fase H_{II}). Imagen adaptada del libro "Membrane structural biology", M. Luckey (14).

Las transiciones de fases se pueden inducir de distintas maneras, pero la más estudiada son las transiciones térmicas. Mediante cristalografía de rayos-X se han identificado una gran variedad de fases gel lamelares con distinto empaquetamiento estructural (en la fase L β las cadenas hidrocarbonadas se encuentran perpendiculares al plano de la bicapa, L β' se encuentra con las cadenas hidrocarbonadas inclinadas, L β I se encuentra en una fase interdigitada y P β' tiene una estructura ondulada), sólo se consideran las características comunes de las estructuras en fase gel. En la fase gel las cadenas hidrocarbonadas están ordenadas en configuración *trans* aportando un orden traslacional de largo alcance, impidiendo el movimiento lateral. Es por eso que esta fase también es llamada fase de sólido ordenado (S_o).

Cuando la temperatura aumenta hasta alcanzar valores más altos que la temperatura de fusión, T_m , el término entrópico es el dominante, dando lugar a una fase de líquido cristalino, $L\alpha$. Esta fase $L\alpha$ se caracteriza tanto por su bajo orden conformacional de las cadenas hidrocarbonadas (bajo orden interno) y por su bajo orden traslacional (bajo orden de empaquetamiento, alta difusión traslacional). Es por ello que esta fase se denomina líquido desordenado (L_d).

La adición de colesterol produce una pérdida de cooperatividad en la transición gel-líquido cristalino. Esto se debe a la introducción de una nueva fase de equilibrio, la fase de líquido ordenado (L_o), la cual sigue teniendo un orden conformacional alto como la fase gel, pero el orden traslacional se ha perdido debido a una alta difusión traslacional como en la fase

Capítulo 1

L α . Estudios teóricos predicen que la transición orden-desorden de las cadenas hidrocarbonadas y la transición orden-desorden del empaquetamiento no son necesarias para ser acopladas, lo que apoya la formación de la fase *L α* . Sin embargo, experimentalmente, la fase *L α* no se ha encontrado en sistemas lipídicos de un solo componente, sólo en sistemas lipídicos que contengan determinados esteroides.

1.1.5. Estabilidad en membranas lipídicas: la fluidez y el papel del colesterol

El estado físico de una membrana lipídica se describe por su fluidez o por su viscosidad*. Teniendo en cuenta que las bicapas, a temperaturas relativamente altas (37°C) sus lípidos se encuentran en estado fluido, su estructura se define como un líquido cristalino bidimensional. Como en un cristal, las moléculas de lípido conservan una orientación específica. Si la temperatura disminuye, los lípidos pasan de estar de líquido cristalino a fase gel. La temperatura a la que se produce este cambio de estado se llama temperatura de transición (*T_m*). Esta temperatura de transición depende de la capacidad de los lípidos a ser empaquetados, lo cual depende del lípido individualmente. Si un lípido tiene insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas, su *T_m* disminuye, al igual, también depende de la longitud de las cadenas acílicas. Si las cadenas acílicas de un lípido son cortas, disminuyen las temperaturas de transición de fase, pero las cadenas largas la aumenta la *T_m*. El estado físico de una membrana también se ve afectada por el colesterol. El colesterol se intercala entre las moléculas de lípido alterando el empaquetamiento compacto de las cadenas hidrocarbonadas interfiriendo en su movilidad. La presencia de colesterol evita los cambios bruscos de temperaturas de transición y crea una condición de fluidez intermedia. Es decir, el colesterol tiende a incrementar la durabilidad de una membrana.

La fluidez de la membrana aporta un equilibrio entre un estado rígido, con una estructura ordenada, y un estado completamente fluido, cuyos componentes no tienen orientación y tienen una baja ordenación. También hace posible que se produzcan interacciones en la membrana, por ejemplo, permite la formación de clústeres de proteínas de membrana para crear sitios de unión específicos y formación de estructuras, como son los sitios de unión intercelulares, complejos de captura de luz fotosintéticos y sinapsis. Gracias a la fluidez de la membrana las moléculas de la membrana pueden interactuar con otras moviéndose libremente por la misma.

* No se debe considerar la fluidez y la viscosidad como sinónimos. La fluidez es la medida de la facilidad con que fluye un material, y la viscosidad es la medida de la resistencia a fluir.

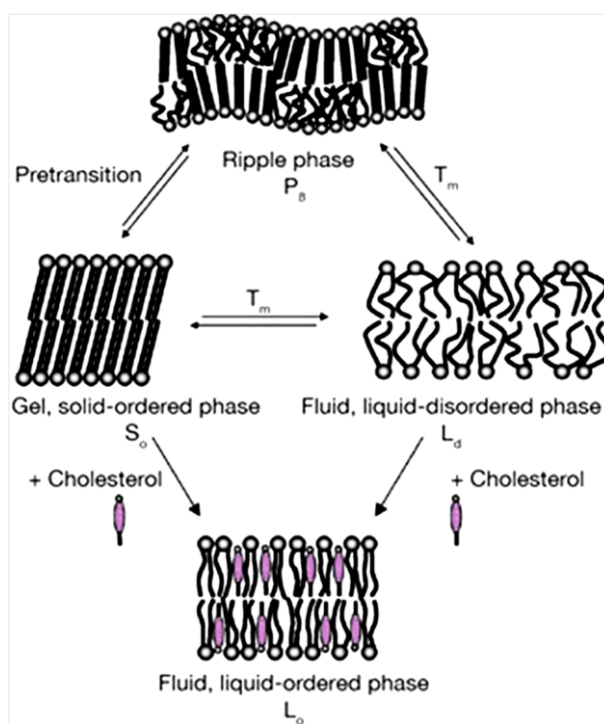


Figura 1-1-7: Esquema de los distintos estados físicos de las bicapas en un medio acuoso en función de la temperatura y composición (15).

El colesterol en las membranas

El **colesterol**, como ya se comentó en el epígrafe 1.1.3.1, pertenece a la familia de los esteroides, lípidos presentes en la inmensa mayoría de las membranas de los organismos eucariotas. Junto a los fosfolípidos es uno de los componentes esenciales para la estructura y el mantenimiento de la estabilidad mecánica de las membranas.

El colesterol es una molécula constituida por cuatro ciclos condensados no aromáticos que le confieren una estructura plana. Además contiene en uno de sus extremos, en la posición ecuatorial [β -OH-Chol], un grupo polar hidroxilo unido directamente al plano molecular (Figura 1-1-8) (18).

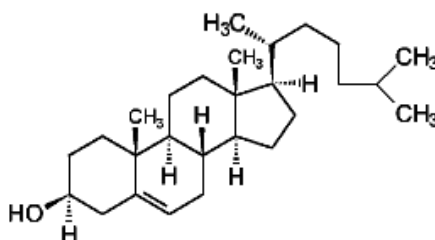


Figura 1-1-8: Estructura química de la molécula de colesterol, obtenida de *Avanti Polar Lipids*.

Al igual que la arquitectura del fosfolípido condiciona la fluidez del sistema, hoy día es motivo de consenso que el colesterol es otro de los actores principales determinantes de dicha

Capítulo 1

fluidez. En las membranas de los organismos eucariotas hay cantidades elevadas de colesterol, pudiendo alcanzar una proporción 1:1, esto es, una molécula de colesterol por cada molécula de fosfolípido. Se cree, aunque no existe evidencia directa y cuantitativa, que el colesterol es el responsable de regular la fluidez y la estabilidad mecánica de la membrana. Sí existen, en cambio, evidencias estructurales sobre la distribución del colesterol en la bicapa. El colesterol tiende a empaquetar el plano molecular a nivel de las colas hidrocarbonadas orientando su grupo hidroxilo de cabeza hacia el exterior de la membrana próximo a las cabezas polares de los fosfolípidos. Sus anillos esteroides planos interaccionan y en parte inmovilizan las regiones proximales de las cadenas hidrocarbonadas, cercanas a los grupos polares de cabeza. Hipotéticamente, esta rigidificación de la parte proximal de las cadenas hidrocarbonadas podría inducir una mayor flexibilidad en el resto de la cadena. Sin embargo, este punto es aún hoy motivo de controversia, existiendo dudas acerca de si dicho efecto es similar en lípidos saturados o insaturados. En el caso de regiones ricas en cadenas saturadas la tendencia del material es a solidificar, en este caso el colesterol actúa como fluidificante, impidiendo que las cadenas hidrocarbonadas se junten y cristalicen. En este sentido, el colesterol ejerce un relevante papel termorregulador de la fluidez de membrana, inhibiendo las posibles transiciones de fase al sólido inducidas por una eventual disminución de temperatura (19).

La fluidez de membrana, al permitir la movilidad tanto de lípidos como de proteínas, potencia la interacción entre ambos. Estas interacciones lípido-proteína juegan un papel muy importante en la estructura de las membranas formando dominios laterales que desempeñan funciones importantes a nivel celular. La caracterización más clásica de los *rafts*, obtenida mediante el estudio de membranas modelo, les asigna un tamaño micrométrico, con mayor orden (20; 21) y menor fluidez (22), a nivel lipídico, que el resto de la bicapa. Aunque tienen una composición variable, están enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, lo que hace que la membrana tenga un mayor espesor en estas regiones (23).

1.2 SISTEMAS ARTIFICIALES DE MEMBRANA MODELO

Las membranas biológicas son sistemas muy complejos y muchos modelos de membrana se han desarrollado para poder estudiar las propiedades de las membranas, estructura y sus procesos así como la actividad de diversos componentes, naturales o sintéticos, como surfactantes, péptidos y fármacos.

Existen sistemas artificiales que pueden ser preparados en el laboratorio en composición y configuración controladas y que por tanto pueden ser utilizadas como membranas modelo. Los sistemas modelo de membrana pueden clasificarse según su forma y origen. Dependiendo de su forma, los modelos de membranas pueden ser compatibles con una gran variedad de métodos, desde ensayos bioquímicos y biofísicos hasta la microscopía.

Los sistemas lipídicos más conocidos son las monocapas, las vesículas y las bicapas soportadas. Aunque cada uno de estos sistemas tiene sus ventajas y desventajas frente a la imitación de las membranas celulares, todos ellos imitan el empaquetamiento lipídico de las membranas celulares naturales. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de las membranas mediante los modelos de monocapas y vesículas lipídicas.

1.1.6. Monocapas lipídicas

Las monocapas de lípidos aportan un modelo simple de mimetización de las membranas biológicas. Estas capas de lípidos insolubles, también llamadas **MONOCAPAS DE LANGMUIR**, se forman al esparcir sobre la superficie de un líquido las moléculas anfifílicas, llegando a formarse lo que se considera, la mitad de la membrana biológica. Este sistema bidimensional aporta ventajas respecto a otros sistemas modelo. Se pueden estudiar parámetros como la naturaleza y empaquetamiento de las moléculas, la composición de la subfase, es decir, el pH, fuerza iónica, y la temperatura se pueden modificar de modo controlado y sin límite.

Las monocapas de lípido se emplean, sobretodo, para la caracterización de las interacciones lípido-lípido y lípido-fármaco, mediante isothermas de compresión, las cuales miden la presión superficial (π) de la interfase de la monocapa en función del área molecular (A) de los compuestos esparcidos en la interfase aire-agua. En los **capítulos 5 y 6** se empleará el uso de monocapas para ver cómo afecta la interacción del citoesqueleto a la membrana lipídica.

1.1.7. Vesículas lipídicas

Las vesículas lipídicas o liposomas son modelos de membrana versátiles comúnmente empleados para el estudio de fusión, reconocimiento molecular, adhesión celular y tráfico en la membrana. Estos ensamblajes lipídicos encierran un compartimento acuoso pequeño donde pueden llevarse a cabo distintas reacciones o ser el medio de transporte para posibles aplicaciones de vectorización de fármacos. A diferencia de las membranas biológicas, los liposomas se caracterizan por estar compuestos por una bicapa lipídica ensamblada de forma similar al sistema biológico (15).

Las vesículas lipídicas se pueden clasificar en función del tamaño y del número de lamelas (Figura 1-1-9). Las *vesículas unilamelares* están formadas por una única bicapa, siendo así buenos modelos de membrana. Se pueden clasificar según su tamaño en *vesículas unilamelares pequeñas (SUVs)*, *vesículas unilamelares grandes (LUVs)*, y *vesículas unilamelares gigantes (GUVs)*. Las *vesículas multilamelares* tienen un tamaño variable.

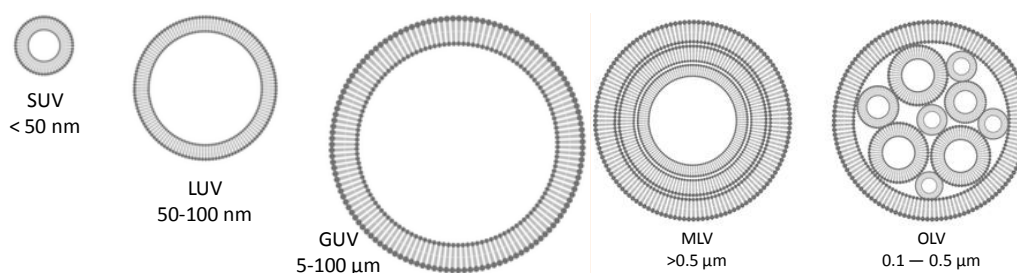


Figura 1-1-9: Dibujos de los distintos modelos de vesículas lipídicas que se emplean como modelos de membrana.

Estos tipos de estructuras lipídicas no sólo se emplean como modelos de biomembrana sino que también se emplean como vehículos para la liberación de fármacos, material genético y enzimas en el interior de una célula viva.

Capítulo 1

Los liposomas se pueden preparar mediante distintas técnicas dependiendo del tamaño que se quiera obtener y del número de lamelas en la vesícula. Pero, a pesar de su uso extenso y sus diversas aplicaciones, el mecanismo de formación no se entiende por completo. En los últimos años, se están desarrollando teorías que tratan de explicar qué factores gobiernan, tanto su formación como su fusión, para generar bicapas planas físicamente adsorbidas a un sustrato (24). La inestabilidad termodinámica inherente a estas estructuras hace muy difícil su análisis. Además, las características físicas de las vesículas producidas (distribución de tamaños, estabilidad y número de lamelas) dependen del método empleado en su preparación (25). Las vesículas multilamelares se forman prácticamente de forma espontánea cuando películas lipídicas secas se hidratan con un exceso de agua o disolución tampón (26; 27).

Sin embargo, las vesículas unilamelares, tanto las *SUVs* como las *LUVs*, presentan energías libres mayores, requiriendo por tanto un aporte de energía al sistema para producirlas (Figura 1-1-10). Normalmente, las *SUVs* son estables durante varias semanas pero después se agregan y fusionan dando lugar a las *LUVs* y *MLVs*. Las *LUVs* tras varios días se transforman en *MLVs* y después dicha dispersión de *MLVs* da lugar a un sistema bifásico en el que coexiste una fase enriquecida en fosfolípido y pobre en agua, con otra pobre en fosfolípido y enriquecida en agua.

Las vesículas unilamelares pequeñas, *SUVs*, presentan tamaños comprendidos entre 20 y 100 nm y pueden prepararse mediante diversas técnicas basadas en aportar energía a suspensiones de vesículas multilamelares. Dicha aportación energética puede hacerse mediante sonicación o mediante extrusión (28; 29; 30). Las vesículas unilamelares grandes, *LUVs*, presentan tamaños desde 0.1 hasta 1 μm , y pueden prepararse mediante el método de eliminación de disolvente (31), método de inyección (32) o método de evaporación de fase reversa (33). Y por último, las vesículas unilamelares gigantes, *GUVs*, presentan diámetros de hasta 100 μm , y pueden prepararse mediante el método de hidratación suave (34; 35), método de evaporación de disolvente (36) o método de electroformación (37). Las condiciones de protocolo comunes a todos estos métodos son la utilización de una baja fuerza iónica y la falta de agitación mecánica. Aunque hoy en día existe un método en el que se emplea fuerza iónica (38).

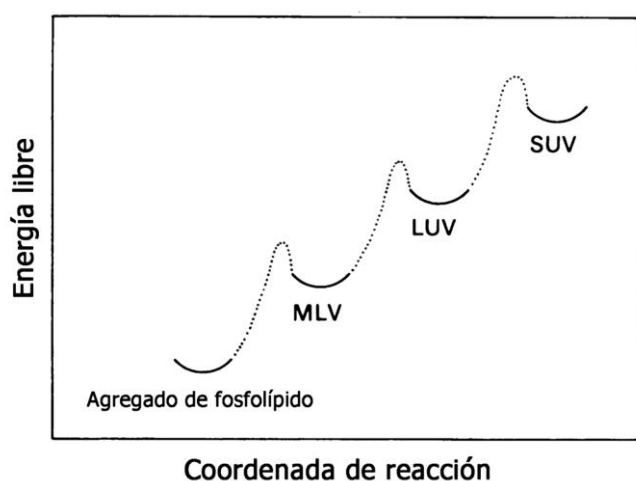


Figura 1-1-10: Diagrama energético de los diferentes agregados lipídicos. El valor de energía mínima de cada estructura está colocado sólo aproximadamente. Si el módulo de curvatura elástica es bajo, la diferencia de energía entre *LUV* y *SUV* disminuye debido a la contribución entrópica (39).

1.3 PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS MEMBRANAS

Para poder entender los factores que determinan la variedad en las formas y transformaciones de las vesículas, desde un punto de vista físico, se debe encontrar una energía libre apropiada para minimizar dichas transformaciones. Para las membranas simétricas, tanto la composición como el entorno de ambas monocapas son idénticos, por lo tanto se encuentran en estado de mínima energía mecánica relativa a una conformación asimétrica que requiere de mecanismos activos para su mantenimiento.

Teniendo en cuenta que el espesor de la bicapa es en torno a 4 nm, y una vesícula gigante es alrededor de 10^4 veces mayor, según esta relación se considera que la membrana tiene una superficie bidimensional $\mathbf{R}(s_1, s_2)$ parametrizada por dos coordenadas (s_1, s_2) inmersa en un espacio tridimensional. Cada superficie se encuentra localizada por dos radios de curvatura R_1 y R_2 para los cuales la curvatura media $H \equiv (1/R_1 + 1/R_2)/2$, y la curvatura Gaussiana, $K \equiv 1/R_1 R_2$. El *modelo de curvatura* asume que la flexión de una membrana tiene un coste energético:

$$1-2 \quad f \equiv (\kappa/2)(2H)^2 + \kappa_G K,$$

donde κ y κ_G son los módulos de curvatura y módulo de curvatura Gaussiana, respectivamente. Estos parámetros tienen dimensiones energéticas mientras que f tiene unidades de energía/área. Para una membrana de fosfolípidos el valor típico es de unos 10^{-19} J o $4 k_B T$ a temperatura ambiente.

Cada borde abierto en un fragmento de membrana expuesto a una superficie acuosa produce un coste energético, es por ello que no existen como tal los fragmentos membrana-rios. Del mismo modo, la topología de una vesícula lipídica no suele cambiar ya que esto implicaría la formación de bordes transitorios. Debido a esto solo se consideran configuraciones de membranas cerradas, por ejemplo, vesículas, para esta energía

$$1-3 \quad F_\kappa \equiv (\kappa/2) \oint dA (2H)^2$$

Dada por la integral de superficie cerrada de la ecuación 1-2. Según el *teorema de Gauss-Bonnet* el segundo término de la integral de 1-2 sólo depende de la topología de la vesícula pero no de su forma, por lo tanto este segundo término se puede despreciar de modo que se pueden considerar las vesículas como elementos con una *topología fija*. (38)

Debido a que la membrana se encuentra en un estado fluido, no puede soportar la cizalla en este plano. Por otro lado, la solubilidad de los fosfolípidos de cadena doble es extremadamente baja. Es por ello que prácticamente no hay intercambio de materia entre la membrana y la disolución. Este hecho, junto con la *baja compresibilidad de la membrana* implica que la membrana se considera incompresible. Para una membrana cerrada, el área total es fija.

Capítulo 1

Las *condiciones osmóticas* de estos sistemas se suelen controlar mediante disoluciones externas. Incluso si se trabaja con agua pura siempre hay impurezas osmóticamente activas alrededor. Debido a que la membrana es permeable al agua, el volumen varía hasta que la diferencia osmótica es prácticamente nula. Los módulos de curvatura que se pueden derivar a partir de (1-3) son demasiado débiles para equilibrar cualquier presión osmótica distinta de cero. Debido a esto, las configuraciones de las vesículas se pueden determinar con un volumen predeterminado V .

Resumiendo, la estabilidad y la conformación de membranas lipídicas están controladas por la entropía conformacional del sistema mediante los parámetros de empaquetamiento molecular. De la estructura molecular emergen también propiedades de equilibrio y mecánicas de los distintos sistemas membrenarios.

Las propiedades mecánicas de un material definen su comportamiento ante deformaciones de diferente naturaleza. Por tanto, la composición lipídica define tanto la estructura como el comportamiento mecánico de sistemas membrenarios, en particular de sistemas lamelares. Extrapolado a biomembranas reales, se puede afirmar que la célula es capaz de amoldar su composición lipídica en diferentes lugares para regular diferentes procesos que van a estar regidos por las propiedades mecánicas locales de membranas (división celular, dinámica mitocondrial, entre otros). Los sistemas lipídicos lamelares, por encima de su temperatura de fusión (T_m), pueden considerarse de manera general, sistemas blandos ya que son fáciles de modificar mediante compresión-expansión, curvatura y cizalla, debido a su carácter fluido (13).

1.3.1. Propiedades termodinámicas (en equilibrio)

Para la realización del estudio de las propiedades de equilibrio en sistemas modelo, se realizan experimentos de variación de la presión superficial de la membrana en función del área de la molécula. Dichos experimentos son las isothermas de compresión-expansión en balanza de Langmuir.

Los fosfolípidos constituyentes de una biomembrana son, en general, muy insolubles en agua y por lo tanto, muy susceptibles a formar monocapas de Langmuir en la interfase A/W. La aproximación experimental para estudiar las propiedades de equilibrio de estas monocapas de Langmuir es la obtención de la isoterma Presión Superficial-Área, π -A, la cual es el equivalente bidimensional a las isothermas p -V de un sistema en 3D. La idea de que las moléculas anfipáticas, insolubles en agua, pueden formar monocapas en la interfase A/W fue establecido a finales del siglo XIX como consecuencia del trabajo de Franklin, Pockels y Lord Rayleigh, pero adquirió suficiente categoría científica a raíz de los trabajos de Irving Langmuir en las primeras décadas del S. XX. El requerimiento estructural necesario para la formación de una monocapa de Langmuir es la combinación en una misma molécula de un grupo hidrofóbico suficientemente largo con un grupo de cabeza polar o cargado. La naturaleza hidrofílica del grupo de cabeza es suficiente para poder anclar la molécula en la superficie del agua permitiendo al grupo hidrofóbico dirigirse hacia el aire, el cual es tremendamente hidrofóbico. Si la molécula, globalmente, es insoluble en agua, la única forma de preparar la monocapa es mediante la dispersión del material desde una disolución orgánica. Estas monocapas se suelen denominar en la literatura *spread films* o monocapas insolubles, o simplemente monocapas de Langmuir.

Este tipo de monocapas es diferente a las formadas por adsorción desde una disolución, denominadas *Monocapas de Gibbs*. Ciertamente es que las fuerzas que dan lugar a la formación de estas monocapas, termodinámicamente estables, son en ambos casos fuerzas de adsorción, que hacen disminuir la energía libre de la interfase. La diferencia es que en el primer caso el material es insoluble en ambas fases adyacentes a la interfase, mientras que en una monocapa de Gibbs el material anfifílico se encuentra disuelto. En estas monocapas de Gibbs hay un equilibrio entre la monocapa y el soluto en disolución (39).

La energía libre de cualquier interfase viene dada por la tensión superficial, γ , que es la variación de la energía libre superficial por unidad de área:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{P,T,n} = G^S$$

1-4

Por lo que la presión superficial, π , es la disminución de la tensión superficial debida a la adsorción de una especie tensioactiva, que no es más que la disminución de la energía libre superficial en dicho proceso de adsorción:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma = G_0^S - G^S$$

1-5

Donde γ_0 es la tensión superficial de la interfase libre (sin monocapa) y γ la tensión superficial de la interfase con la monocapa adsorbida.

La presión superficial será positiva si el proceso de adsorción de la monocapa es espontáneo:

$$\pi > 0 \text{ si } \Delta G^S = G^S - G_0^S < 0$$

1-6

La técnica experimental fundamental para el estudio de monocapas insolubles es la **balanza de Langmuir**, que es un dispositivo en el que se mide la presión superficial en función del área a una temperatura fijada. Los elementos esenciales son una balanza que, mediante la técnica del plato de Wilhelmy, permite determinar la tensión superficial, y la célula de material inerte e hidrófobo (actualmente de Teflón®), de forma rectangular y pocos milímetros de altura, que debe ser lo suficientemente larga como para poder realizar experimentos en un amplio intervalo de áreas. Esta cubeta contiene la subfase, generalmente de carácter acuoso y sobre la cual se forma la monocapa adsorbida, objeto de estudio.

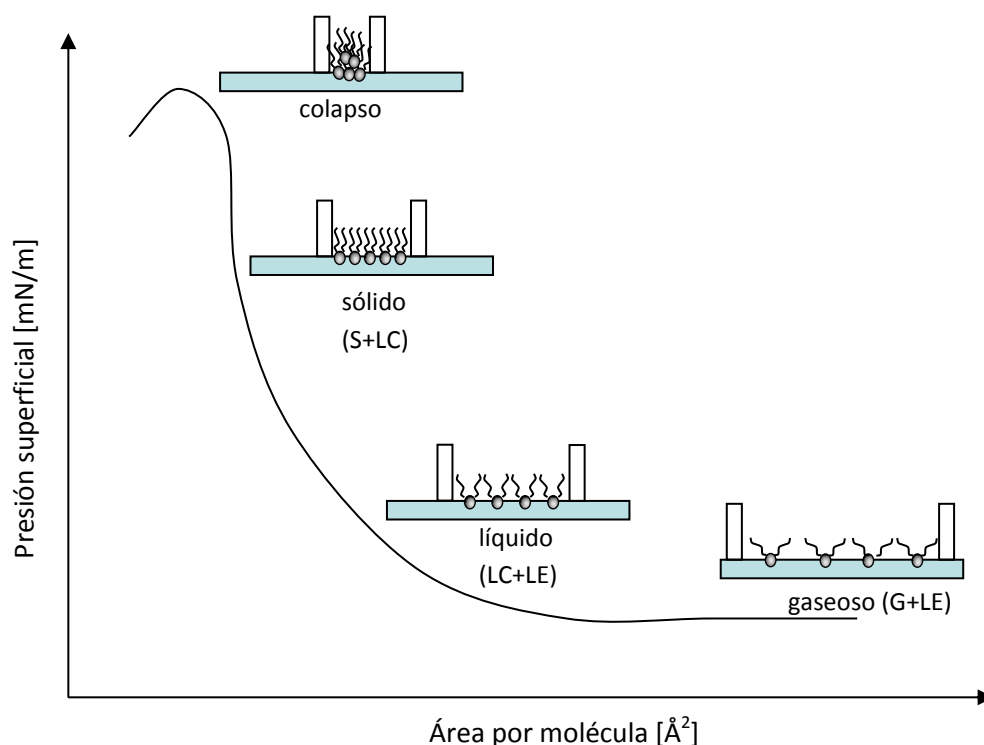


Figura 1-1-11 Representación esquemática de una isoterma π -A de una monocapa lipídica y las estructuras características a cada estado de presión (40)

A partir de las isotermas π -A (Figura 1-1-11), se pueden poner en evidencia las distintas regiones que corresponden a diferentes estados de la monocapa, además de las zonas de presión constante correspondientes a la región de coexistencia de dos estados. Los distintos estados se identifican fácilmente durante la compresión de la monocapa para obtener la isoterma. La compresión empieza a áreas grandes ($\pi \approx 0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), donde la monocapa se encuentra en estado gaseoso G ; cuando es comprimida comienza a formarse el líquido expandido LE , apareciendo una región a presión constante ($\pi \approx 0,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), correspondiente a la existencia entre el gas y el líquido expandido ($G+LE$). Una vez el sistema se encuentra en LE , la disminución de la superficie de la balanza de Langmuir produce un incremento leve de la presión superficial. Si la monocapa es comprimida de tal manera que el área accesible a cada molécula es similar a su sección circular, el sistema pasa al Líquido Comprimido LC , presentando de nuevo una región de coexistencia de fases caracterizada por un tramo de pendiente casi-horizontal ($LE+LC$). Dentro del LC , pequeñas disminuciones del área producen un considerable aumento de la presión superficial. Finalmente, el sistema puede formar un sólido bidimensional (S). En la región de coexistencia $G-LE$, la presión superficial es claramente constante, se trata de una transición de primer orden. La naturaleza de la transición $LE-LC$ es aún hoy día un motivo de fuerte controversia en la literatura. Experimentalmente no se encuentra un tramo de pendiente estrictamente horizontal, lo cual puede hacer pensar en una transición de orden superior; sin embargo, otros autores defienden que dicha curvatura de la isoterma en la zona de transición es debida a la presencia de trazas de impurezas o a que en estos estados tan densos es muy difícil realizar un camino de compresión en equilibrio a una velocidad finita. Un cuidadoso estudio realizado por Pallas y Pethica (40) en monocapas de Langmuir de ácidos grasos de elevada pureza, puso de manifiesto que la transición $LE-LC$ es de primer orden si la velocidad de com-

presión no es demasiado elevada y se controla la humedad relativa (98-100%). La determinación del potencial superficial se revela como técnica complementaria de extrema utilidad para determinar las regiones de coexistencia de fases.

Obtenida la isoterma π -A para una determinada monocapa es posible calcular todas las magnitudes termodinámicas que caracterizan el estado de equilibrio del sistema. Una propiedad de especial interés, pues sirve para identificar el carácter fluido o sólido de las fases superficiales, es el denominado módulo de compresión de la monocapa, ε , cuyo significado físico es equivalente al del módulo de compresibilidad isoterma en sistemas 3D:

$$1-7 \quad \varepsilon = \frac{-\Delta\pi}{(\Delta A/A)}$$

Dicho módulo adopta valores inferiores a $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ en estados fluidos de baja densidad y orden, el denominado Líquido Expandido, LE. Existe una fase superficial fluida, pero con orden hexático de corto alcance, denominada Líquido Comprimido, LC, la cual aparece a altas densidades y bajas temperaturas (generalmente a áreas inferiores a 30 \AA^2 por molécula en el caso de tensioactivos monocatenarios). El LC viene caracterizado por valores de ε superiores a $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Las fases sólidas bidimensionales son de muy baja compresibilidad, por tanto el módulo de compresión suele exceder en estos casos los $100 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Los compuestos de cadena acíclica corta dan estados LE a temperatura ambiente y LC a baja temperatura. Según aumenta la longitud de la cadena aparecen estados LC a temperatura ambiente. La temperatura de fusión de un determinado fosfolípido corresponde a la transición entre el estado gel (equivalente al LC en 2D) y el estado sólido en la bicapa o en la monocapa. En el estado gel (LC) los fosfolípidos están condensados de tal manera que las cadenas de acilo están en conformación *todo-trans*. Al subir la temperatura se producen cambios conformacionales de *trans* a *gauche* y la cadena acíclica funde al tiempo que el orden de largo alcance se pierde. Para concluir, los estados densos fluidos (LC o gel) presentes en las biomembranas se alcanzan a presiones elevadas o bajas temperaturas. Es por tanto la presión superficial el parámetro que nos puede ayudar a identificar y asociar un determinado estado de las monocapas o bicapas vesiculares modelo con el correspondiente estado de la biomembrana real. A efectos comparativos en este punto sería conveniente invocar el Principio de Equivalencia Monocapa-Bicapa. De hecho, recientemente S.S. Feng y cols. (41) han establecido una relación unívoca entre la presión superficial de una monocapa y su equivalente en la bicapa. Para ello han definido la presión de la bicapa o presión lateral, ε , como la presión intrínseca de la bicapa lipídica debida a la suma de la interacción repulsiva neta de los lípidos dentro de la bicapa y la interacción hidrófila de los grupos de cabeza enfrentados en ambas monocapas. Haciendo uso del Principio de Equivalencia Monocapa-Bicapa estos autores establecen con carácter general la equivalencia entre la presión superficial de la monocapa y su equivalente en la bicapa:

$$1-8 \quad \pi_B \equiv 2\Pi$$

Se ha determinado que la presión de bicapa a la que se encuentran la mayor parte de las membranas biológicas en equilibrio es del orden de $\varepsilon \approx 70 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, lo cual establece que los

modelos de monocapa equivalentes deberían ser estudiados a una presión superficial alrededor de $\pi \approx 30\text{-}35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

1.3.2. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas en membranas modelo se pueden estudiar tanto en monocapas (experimentos de cizalla, compresión-expansión), como en bicapas (estudio de la curvatura, cizalla).

Una membrana lipídica tiene un espesor aproximado de 5 nm , por lo que macroscópicamente, la membrana puede aproximarse al modelo de un objeto bidimensional embebido en un espacio tridimensional, lo cual le confiere unas características mecánicas particulares. Las bicapas lipídicas son elásticas y pueden ser deformadas de tres formas: extensión-compresión, deformación por cizalla a superficie constante y deformación perpendicular a un plano de la membrana por curvatura Figura 1-1-12. Cada una de estas tres deformaciones tiene asociada una energía elástica (42).

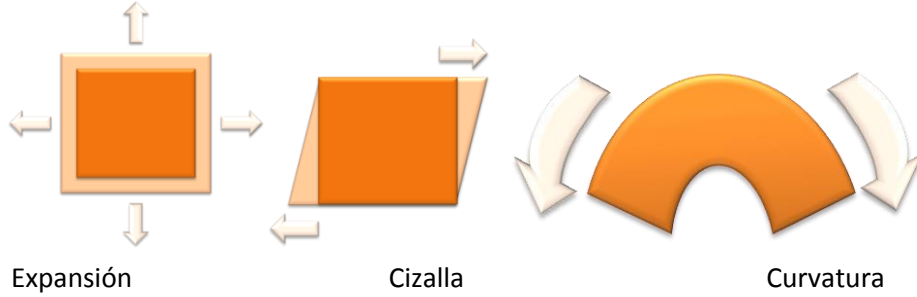


Figura 1-1-12: modos de deformación de una membrana.

La energía de extensión-compresión por unidad superficial de membrana (\mathcal{F}_{ext}) depende del cambio relativo del área $\Delta A/A$ de manera cuadrática:

$$\mathbf{1-9} \quad \mathcal{F}_{\text{ext}} = \frac{1}{2} \varepsilon \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2$$

Donde ε es el módulo de compresibilidad, mientras que la energía asociada a la deformación por cizalla se define como:

$$\mathbf{1-10} \quad \mathcal{F}_{\text{ciz}} = \frac{1}{2} \mu (\tilde{\lambda}^2 + \tilde{\lambda}^{-2} - 2)$$

Siendo $\tilde{\lambda} = (L_0 + \Delta L)/L_0$ la variación de la extensión lateral y μ el módulo de cizalla, cuya energía es despreciable para una membrana fluida. En el caso de membranas cristalinas o polimerizadas, la contribución a los modos de cizalla debe ser considerada.

Para poder definir la energía de curvatura, si consideran dos superficies curvas uniformes, de composición molecular dada, la energía por unidad de área para doblar una bicapa incrementa con la curvatura. La descripción más simple para esta densidad de energía tiene involucrado el término de la curvatura cuadrática media $(C_1 + C_2)^2 = (1/R_1 + 1/R_2)^2/4$ y la

curvatura Gaussiana $C_1 C_2 = 1/R_1 R_2$, donde R_1 y R_2 son los radios de curvatura. De este modo se puede escribir la densidad energética \mathcal{F}_{curv} como:

$$1-11 \quad \mathcal{F}_{curv} = \frac{1}{2} \kappa_B \cdot \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 + \frac{\kappa_G}{R_1 R_2},$$

donde los parámetros κ_B y κ_G específicos del material, son el módulo de curvatura o rigidez y el módulo de curvatura Gaussiana respectivamente. Ambos parámetros tienen unidades de energía. La curvatura Gaussiana introduce un término, que integrado sobre una superficie cerrada es una invariante del sistema que tan solo depende de la topología de la superficie (*teorema de Gauss-Bonnet*). (43; 44)

Teniendo en cuenta lo desarrollado anteriormente, se puede definir la energía elástica por unidad de superficie como:

$$1-12 \quad \mathcal{F} = \mathcal{F}_{ext} + \mathcal{F}_{ciz} + \mathcal{F}_{curv}$$

$$\mathcal{F} = \frac{1}{2} \varepsilon \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 + \frac{1}{2} \mu (\tilde{\lambda}^2 + \tilde{\lambda}^{-2} - 2) + \frac{1}{2} \kappa_B \cdot \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 + \frac{\kappa_G}{R_1 R_2},$$

Donde los coeficientes ε , μ y κ son los correspondientes módulos elásticos bidimensionales.

Otro de los parámetros que definen el comportamiento mecánico de una membrana es la tensión lateral, σ . Cuando se aplica una fuerza externa sobre la membrana, la superficie total de la membrana varía pasando a un estado tensionado. La existencia de este estado tensionado se debe a la variación de la superficie de la membrana y a la tensión superficial. Cuando varía la superficie ΔA , la energía libre aumenta en $\sigma \Delta A$. Atendiendo a la definición de tensión superficial $\sigma = \partial \mathcal{F} / \partial A$, donde \mathcal{F} es la energía libre de la membrana (45), se podría añadir un nuevo término energético debido a la tensión lateral de la membrana a la energía elástica que viene dado por la expresión:

$$1-13 \quad \mathcal{F}_{tens} = \sigma \cdot \frac{\Delta A}{A}$$

1.3.2.1. Fluctuaciones de membrana

Las membranas lipídicas, debido a la fluidez que presentan, son muy dinámicas. Cuando existe un exceso de área en una membrana se producen deformaciones inducidas térmicamente, es decir, se debe a los movimientos Brownianos del entorno, principalmente por moléculas de agua, hacia la bicapa lipídica. La energía transferida a la membrana por el movimiento Browniano de las moléculas es del orden de $k_B T$, siendo k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. Mediante el estudio de las fluctuaciones térmicas es posible obtener información de los parámetros mecánicos que gobiernan el sistema de estudio.

Estas fluctuaciones se deben a la temperatura, fuente de la perturbación, y a las propiedades mecánicas de la membrana que caracterizan a la resistencia a ser curvadas como es el módulo de elasticidad. Cuando la superficie en exceso es cercana a cero significa que las vesículas son pequeñas y no muestran fluctuaciones.

Capítulo 1

Los primeros modelos propuestos para el análisis del movimiento térmico de membranas consideraban que las fluctuaciones de membrana ocurrían en una escala espacial más pequeña que las dimensiones del sistema, por lo que se consideró la bicapa como un plano de naturaleza continua, donde la energía total de una membrana fluida que fluctúa está dominada principalmente por dos términos, la energía de curvatura (\mathcal{F}_{curv} 1-11) y la tensión (\mathcal{F}_{tens} 1-13). Con la ayuda de la geometría diferencial (46) se puede demostrar que la curvatura local de la membrana es (47) $C = 1/R_1 + 1/R_2 = (\nabla^2 \zeta)^2$, donde ζ es la amplitud de las fluctuaciones de un punto de la membrana en un tiempo t . La contribución de la tensión lateral a la energía elástica de la membrana puede ser expresada en función de la amplitud de las fluctuaciones (48) como:

$$1-14 \quad \frac{\Delta A}{A} = \nabla \zeta$$

en este modelo llamado modelo de curvatura, la energía total de la membrana viene descrita por:

$$1-15 \quad \mathcal{F} = \iint_A \left[\frac{1}{2} \kappa (\nabla^2 \zeta)^2 + \frac{1}{2} \sigma (\nabla \zeta)^2 \right] dS$$

Donde \mathcal{F} es el Hamiltoniano de Canham-Helfrich, en el que intervienen el módulo de curvatura, κ , y la tensión lateral, σ , así como un desarrollo en serie de orden dos en ζ .

1.3.2.1.1. Espectro de fluctuaciones

El espectro de fluctuaciones es la representación gráfica de cuánto se desplaza perpendicularmente la bicapa respecto de su posición media. En él, se cuantifica la intensidad de las fluctuaciones térmicas respecto de un plano de referencia. Esta intensidad, es obtenida a partir de la amplitud del desplazamiento de la membrana ζ .

Su cálculo es realizado en el espacio recíproco introduciendo la transformada de Fourier de $(x, y, t) = (\mathbf{r}, t)$ considerando a \mathbf{r} como el vector de posición bidimensional con coordenadas (x, y) , donde las coordenadas q_x, q_y están definidas por

$$1-16 \quad \zeta(\mathbf{r}, t) = \iint \zeta(\mathbf{q}, t) \exp(i\mathbf{q}\mathbf{r}) d^2q$$

Al ser puramente térmica la fuente de las fluctuaciones en equilibrio, puede aplicarse el teorema de equipartición de la energía, de tal modo que para cada grado de libertad la energía libre promedio es $\langle \mathcal{F} \rangle = k_B T / 2$ para un modo del vector de onda definido por q , expresado el promedio estadístico[†], en el tiempo de los desplazamientos cuadráticos de la membrana respecto de su posición de equilibrio $\langle \zeta_q \zeta_q \rangle$, se deduce el espectro de fluctuaciones (43):

$$1-17 \quad \langle \zeta_q \zeta_q \rangle = \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2}$$

[†] Aquí el símbolo $\langle \rangle$ describe el promedio estadístico.

A través de esta ecuación, es posible cuantificar la energía necesaria para curvar una membrana inicialmente plana mediante un modo de curvatura, donde la energía térmica se reparte por igual sobre todos los modos de fluctuación ($qR = n = 1, 2 \dots q_{m\acute{a}x}$). Sin embargo, los modos más pequeños son más fáciles de excitar y la amplitud de fluctuación observada en ellos es mayor, por lo que la amplitud disminuye a medida que se incrementa q . En una membrana esférica, como es el de una vesícula lipídica, sólo los modos compatibles con los armónicos esféricos que se distribuyen discretamente sobre la superficie de la esfera son posibles. Una de las consecuencias que derivan de la expresión anterior es la presencia de dos regímenes de fluctuaciones existentes en función de q , uno dominado por curvatura si $q > q_c$ donde $q_c = \sqrt{\sigma/\kappa}$, y un segundo régimen dominado por la tensión, para vectores de onda $q < q_c$.

De este modo, en un régimen dominado por la curvatura ($\sigma = 0$), se puede obtener información acerca del orden de magnitud de la amplitud de las fluctuaciones si se integra la ecuación anterior entre los $q_{mín} = 2\pi/L$ y $q_{m\acute{a}x} = 2\pi/a$, se obtiene:

$$1-18 \quad \langle \zeta(L) \rangle \propto \sqrt{\frac{k_B T}{\kappa}} L$$

para una membrana típica de $L = 10 \mu m$ y $\kappa = 10 k_B T$, la amplitud, $\langle \zeta(L) \rangle$, valdría $3 \mu m$, mientras que en un régimen dominado por tensión, la amplitud disminuye considerablemente. Debe destacarse que la amplitud de las fluctuaciones aumenta linealmente con las dimensiones de la membrana, lo que indica que una membrana macroscópica tiene fluctuaciones gigantes respecto a una membrana de dimensiones microscópicas.

$$1-19 \quad \langle \zeta(L) \rangle \propto \sqrt{\frac{k_B T}{\sigma} \ln \frac{L}{a}}$$

Considerando los valores típicos de $\sigma = 1 \times 10^{-6} N m^{-1}$ y $a = 0.5 nm$, siendo a una longitud microscópica cualquiera, la amplitud se reduciría 50 veces ($\langle \zeta(L) \rangle = 0.06 \mu m$) (13; 43).

1.3.2.1.2. Dinámica de membranas

Hasta ahora, los modelos presentados basan sus resultados en un promedio temporal de las fluctuaciones y como consecuencia, el análisis del espectro de fluctuaciones no accede a la información dinámica del sistema. Se ha visto como la energía térmica se comporta como la fuerza motriz de las fluctuaciones de la membrana, pero del mismo modo, existe una fuerza que se encarga de disipar el movimiento de la membrana. Si se considera que una membrana fluctúa en un medio de viscosidad η , la fricción con el fluido que la rodea ejercerá una fuerza que se opondrá al movimiento generado por la energía térmica de la membrana. Si se entiende como disipación la disminución de la amplitud de las fluctuaciones de la membrana en función del tiempo debido al rozamiento con las partículas del medio, se puede decir que esta disminución depende de la viscosidad de dicho medio.

Teniendo en cuenta la ecuación del movimiento para un fluido incompresible en ausencia de fuerzas inerciales, sabiendo que en régimen browniano, la velocidad de la membrana es constante y viene dada por la velocidad límite (49; 50; 51; 52), se puede obtener la expresión para la función de autocorrelación temporal de las fluctuaciones.

Capítulo 1

$$1-20 \quad \langle \zeta(q, t), \zeta(q', t') \rangle = \frac{k_B T}{\kappa q^4 + \sigma q^2} \exp(-\Gamma t)$$

Con una frecuencia de relajación (Γ), la cual aporta información de la influencia de la disipación por viscosidad ejercida por el disolvente acuoso sobre las fluctuaciones de la membrana:

$$1-21 \quad \Gamma = \frac{\kappa q^3 + \sigma q}{4\eta}$$

Esta expresión de la frecuencia de relajación es el resultado previsto en la teoría clásica para la disipación de las fluctuaciones térmicas. Los términos del numerador proceden de la frecuencia del oscilador mecánico análogo e las fluctuaciones transversales de la membrana y el denominador da cuenta de la energía disipada por la fricción de la viscosidad entre la membrana en movimiento en el seno de un fluido de viscosidad η .

La función de autocorrelación temporal de las fluctuaciones informa de la dependencia de la frecuencia de relajación de las fluctuaciones en función del vector de onda para los distintos regímenes, de forma que cuando $\Gamma \sim q$ nos encontramos en un régimen dominado por tensión y cuando $\Gamma \sim q^3$ estamos en un régimen dominado por elasticidad de curvatura.

1.4 PROTEÍNAS DE ADHESIÓN CELULAR: CADHERINAS

La **adhesión** de las células entre sí y con su entorno es un proceso esencial en el complejo desarrollo de la vida multicelular. Es esencial en la regulación de la mayoría de los fenómenos intra- y extracelulares como la *migración*, *diferenciación* y *apoptosis celular*.

Los mecanismos de cohesión gobiernan la arquitectura del cuerpo, es decir, la fuerza y forma de sus distintos tipos celulares. Las uniones entre células crean vías de comunicación permitiendo a las células intercambiar señales para coordinar su comportamiento y regular sus patrones de expresión genética. Las uniones entre células y matriz extracelular controlan la orientación de las células en su estructura interna. Estas uniones celulares, los mecanismos de adhesión y la matriz extracelular son críticos para la mayoría de los procesos de organización, función y dinámica de estructuras multicelulares. Defectos en estas uniones pueden desarrollar una gran variedad de enfermedades.

El cómo pueden mantenerse estas estructuras formadas por millones de células manteniéndose fuertes y estables se debe a dos estrategias básicas. Una de ellas depende de la fuerza de la matriz extracelular, que es una red compleja formada por cadenas de polisacáridos y proteínas que son secretados por la célula. Otra de las estrategias depende de la fuerza del citoesqueleto de las células y de la adhesión célula-célula que mantiene unidos a los citoesqueletos de células vecinas (53; 54; 55).

1.4.1. Proteínas y adhesión celular

Los procesos de adhesión se rigen por la interacción compleja entre las fuerzas de unión y fuerzas no específicas mediadas por diversas interacciones. Las moléculas que conforman el glicocáliz de la célula dan lugar a fuerzas repulsivas debido al impedimento estérico. Por otro lado, los lípidos de membrana están cargados, en el caso de la fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), son lípidos *zwiteriónicos*, pero el PS tiene carga neta negativa.

La orientación del lípido en la membrana conduce a la formación de la doble capa eléctrica (también conocida como la capa de Stern) hace que exista una repulsión de corto alcance y debido a esa distancia (distancia de Debye, k^{-1} disminuye si la concentración de sal aumenta), donde la repulsión es mayor que la agitación térmica, hace que las membranas lipídicas no tengan una adhesión espontánea entre sí. Por ello son necesarias las moléculas de adhesión celular (CAM).

Las CAM se pueden dividir en cuatro superfamilias de proteínas: las integrinas, las selectinas, las inmunoglobulinas – todas ellas independientes de calcio – y las cadherinas (dependientes de calcio). A pesar de que existen diversos tipos de familias implicadas en procesos de adhesión, la superfamilia de las cadherinas es particularmente importante en los procesos dinámicos de regulación de los contactos adhesivos que están a su vez relacionados con diversos procesos morfogénéticos. (Figura 1-4-13)

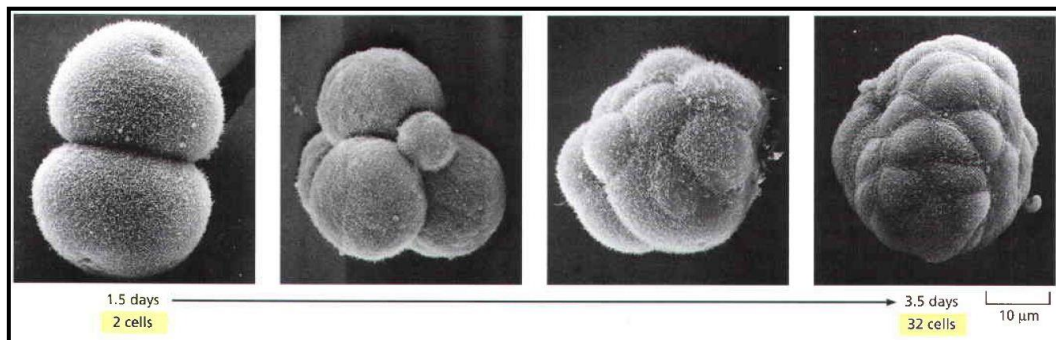


Figura 1-4-13: Primeras fases del desarrollo embrionario en fase morular. Las células embrionarias tempranas en los primeros días se mantienen unidas de forma débil. Cerca de la octava fase del desarrollo comienzan a expresar E-cadherina y da como resultado una adhesión fuerte y cercana de unas células con otras. Imagen tomada de Gerald Karp “Cell and molecular biology concepts”.

En el desarrollo embrionario las cadherinas controlan la mayoría de los procesos de separación de las distintas capas de tejidos o la fusión de varias masas de tejidos, al igual que la diferenciación y conversión de estados celulares como son las células epiteliales y mesenquimales, pero también están controlando tanto la migración celular como los procesos neuronales y dando lugar a la sinapsis entre neuronas.

Dada la gran variedad de procesos biológicos que están mediados por cadherinas, no es de sorprender que existan una gran variedad de mecanismos celulares implicados en la regulación de la adhesión celular y la formación de juntas adherentes. La E-cadherina o cadherina epitelial, siendo una de las más estudiadas, forma las llamadas uniones adherentes en las células epiteliales que facilita la formación del complejo de unión epitelial (2).

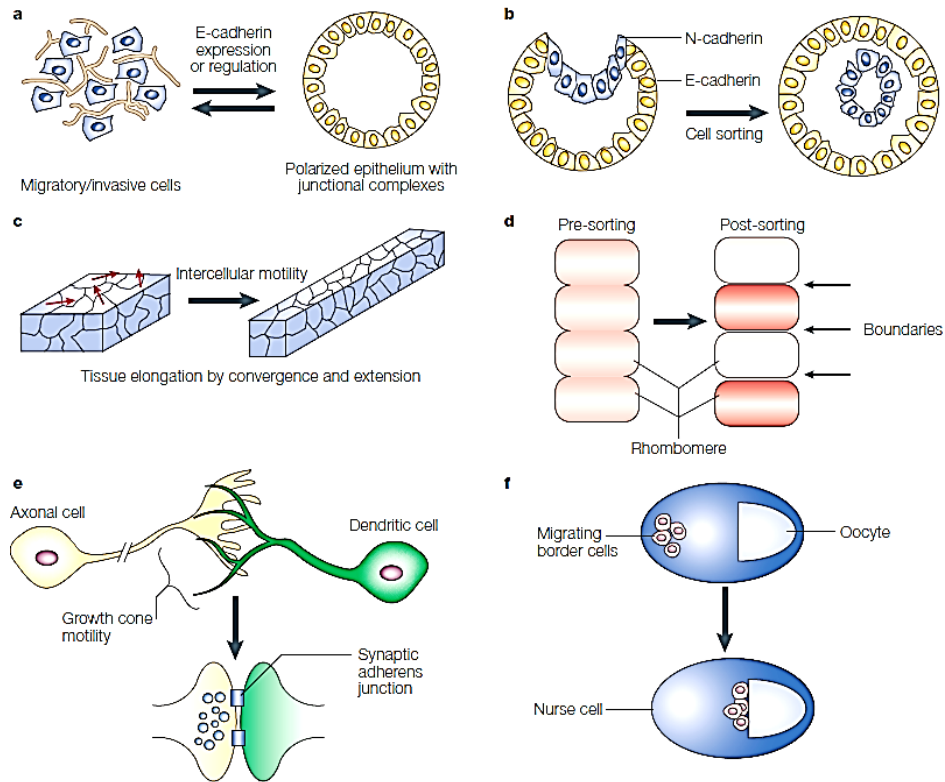


Figura 1-4-14 Ejemplos de regulación por cadherinas en la morfogénesis tisular. (Adaptada de Barry M. Gumbiner, *Nature review*, 2005) (54).

1.4.2. Las cadherinas como proteína de adhesión

Las cadherinas son moléculas hemofilicas que se caracterizan por interaccionar solamente con moléculas de la misma familia y son las responsables de la formación de contactos célula-célula estables en presencia de iones calcio. De hecho, su propio nombre nos indica que son dependientes de calcio (Ca^{2+}).

Las principales funciones de estas proteínas son la mediación de las adhesiones célula-célula en el medio extracelular, son buenos receptores y transmisores de señales y se unen al citoesqueleto a través de las fibras de actina gracias al complejo de cateninas del dominio citosólico (57).

Dentro de la superfamilia de las cadherinas existen las cadherinas tipo I (clásicas o “C-cadherinas”) que dependen de su localización como la E-cadherina (en células epiteliales), N-cadherina (en células neuronales) y la P-cadherina (en células placentales); las cadherinas tipo II (atípicas), desmocolinas, desmogleínas, protocadherinas y cadherinas flamingo.

La estructura de las C-cadherinas se divide en tres claras partes: un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un fragmento citosólico.

En presencia de Ca^{2+} (58), en el medio extracelular (*EC*), se producen dos tipos de adhesión entre cadherinas (59): cuando la adhesión es entre dos cadherinas de la misma célula se forman los dímeros y se le llama adhesión *cis*; sin embargo, cuando existe una adhesión entre células vecinas, la adhesión es intercelular y la interacción es *trans*. Este tipo de adhesión forma clúster de cadherinas y se dice que se forma una “*cremallera*” de cadherinas.

1.4.3. Estructura de las cadherinas

Las cadherinas clásicas son proteínas con una única hélice transmembrana que interaccionan con un gran número de distintas proteínas citoplasmáticas que llevan a cabo su función como la adhesión célula-célula, el anclaje del citoesqueleto o la señalización. Forman un complejo proteico que consiste en un dímero *cis* paralelo de cadherinas y cateninas polipeptídicas. La α -catenina interacciona, a través de la β -catenina, con la parte distal del dominio citoplasmático de la cadherina, y la catenina p-120 interacciona con la región proximal del dominio citoplasmático. Estas proteínas de la cadherina están presentes en todos los complejos de cadherinas. La α -catenina puede mediar la unión física con el citoesqueleto de actina, bien sea de forma directa a través de la unión con los filamentos de actina, o de forma indirecta a través de otras proteínas de unión a la actina.

El dominio extracelular de las cadherinas clásicas consiste en un tándem de cinco ectodominios repetidos llamados dominios *EC* (cadherina extracelular) (60) y están enlazados a través de uniones de calcio en una estructura de tipo laminar. El dímero del dominio extracelular media la función de unión adhesiva que está regulada por las cateninas y el dominio citoplasmático.

El ectodominio está constituido por unos 110 aminoácidos distribuidos en una estructura de tipo lámina β antiparalela. El tándem de ectodominios se nombra del *EC1* al *EC5* desde el N_t al C_t respectivamente, siendo el N-terminal el dominio distal de la molécula a la membrana (*EC1*).

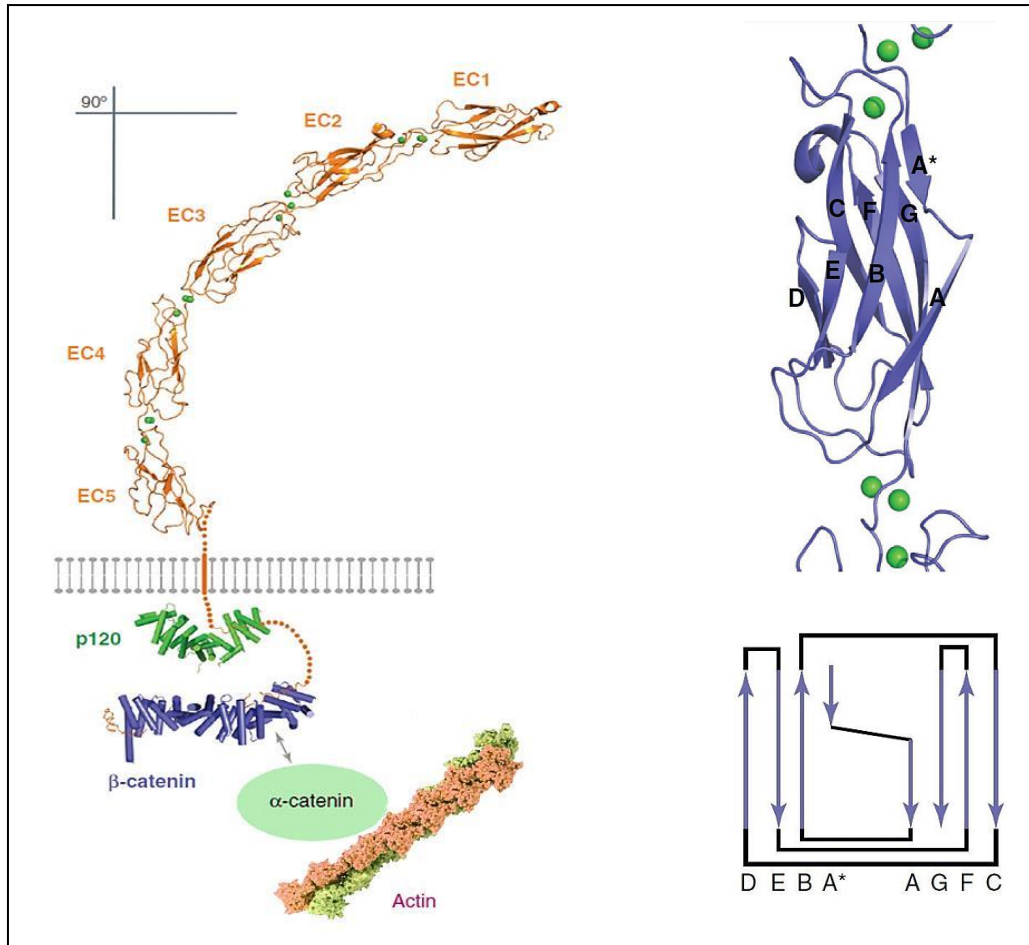


Figura 1-4-15: Izquierda, dibujo de la estructura de la cadherina donde se presenta el dominio extracelular, fragmento transmembrana y fragmento citosólico (conjunto de cateninas) que interaccionan con la actina, proteína de citoesqueleto. Derecha, detalle de la estructura laminar un ectodominio, en verde Ca^{2+} .

1.4.4. Uniones entre cadherinas

El ensamblaje de la gran mayoría de estructuras proteicas incluye dos pasos fundamentales: la nucleación y la elongación, éste último basado en las interacciones cooperativas entre la distintas subunidades de la estructura. Todo proceso de ensamblaje viene acompañado por su proceso inverso de desensamblaje y el equilibrio entre estos dos procesos suele determinar el tamaño y dinámica de la estructura. Estudios recientes demuestran que la formación de estas uniones se debe a un sistema de cooperación entre las interacciones *cis* y *trans* de los ectodominios de las cadherinas (61). Estas reacciones de autoensamblado forman clúster de adhesión de cadherinas y son de los más estudiados en la actualidad en la formación de las uniones adherentes. No solo depende de estas interacciones *cis-trans*, el citoesqueleto de actina se reorganiza y controla los ciclos de protrusión-retracción de las membranas plasmáticas de las células que están en contacto. El cómo llegan a coordinarse estas dos actividades todavía se desconoce. Cabe destacar que este tipo de interacción sólo se da en cadherinas de vertebrados; en cadherinas de invertebrados el mecanismo es distinto y está menos estudiado.

1.4.4.1. Base estructural de la adhesión homofílica

Existen varias aproximaciones experimentales que demuestran que el sitio de unión de una cadherina se encuentra en el dominio *EC1* (59). Mediante diversas técnicas experimentales (ensayos de co-inmunoprecipitación (63), microscopía electrónica [(64)], estudios de *cryo-TEM* de desmosomas, (64; 65), estudios de *FRET* (66) (67)) se determinó que el sitio de unión se encuentra en el amino terminal (Nt) del *EC1*. Se observó también que el sitio de unión adhesiva de la cadherina corresponde a la interfase del dímero de intercambio (68), detectado en la primera estructura tridimensional de N-cadherina por *Shapiro et al* en 1995 (69).

Gracias a estos estudios estructurales se conoce que la base de la adhesión entre las cadherinas clásicas se centra en la unión a través de los ectodominios de las membranas opuestas formando dímeros *trans* mediante los dominios *EC1*, dominios distales, formando las uniones intermembrana entre los espacios de las células vecinas. El mecanismo de unión de las cadherinas es un mecanismo de intercambio de dominios en la interfase de unión, en el que la mayor parte de la lámina β -A, la lámina A* (70; 71), del N-terminal, se solapan entre los dominios *EC1* de las parejas de adhesión mediante un sistema de “*strand swapping*” (72) o intercambio de láminas. El factor fundamental para que funcione el mecanismo de adhesión es el acoplamiento de los residuos de anclaje hidrofóbicos conservados localizados en la lámina A* – el triptófano en la posición 2 (*Trp2*) para las cadherinas de tipo I – en el hueco hidrofóbico conservado en el cuerpo del dominio *EC1* vecino (73; 74).

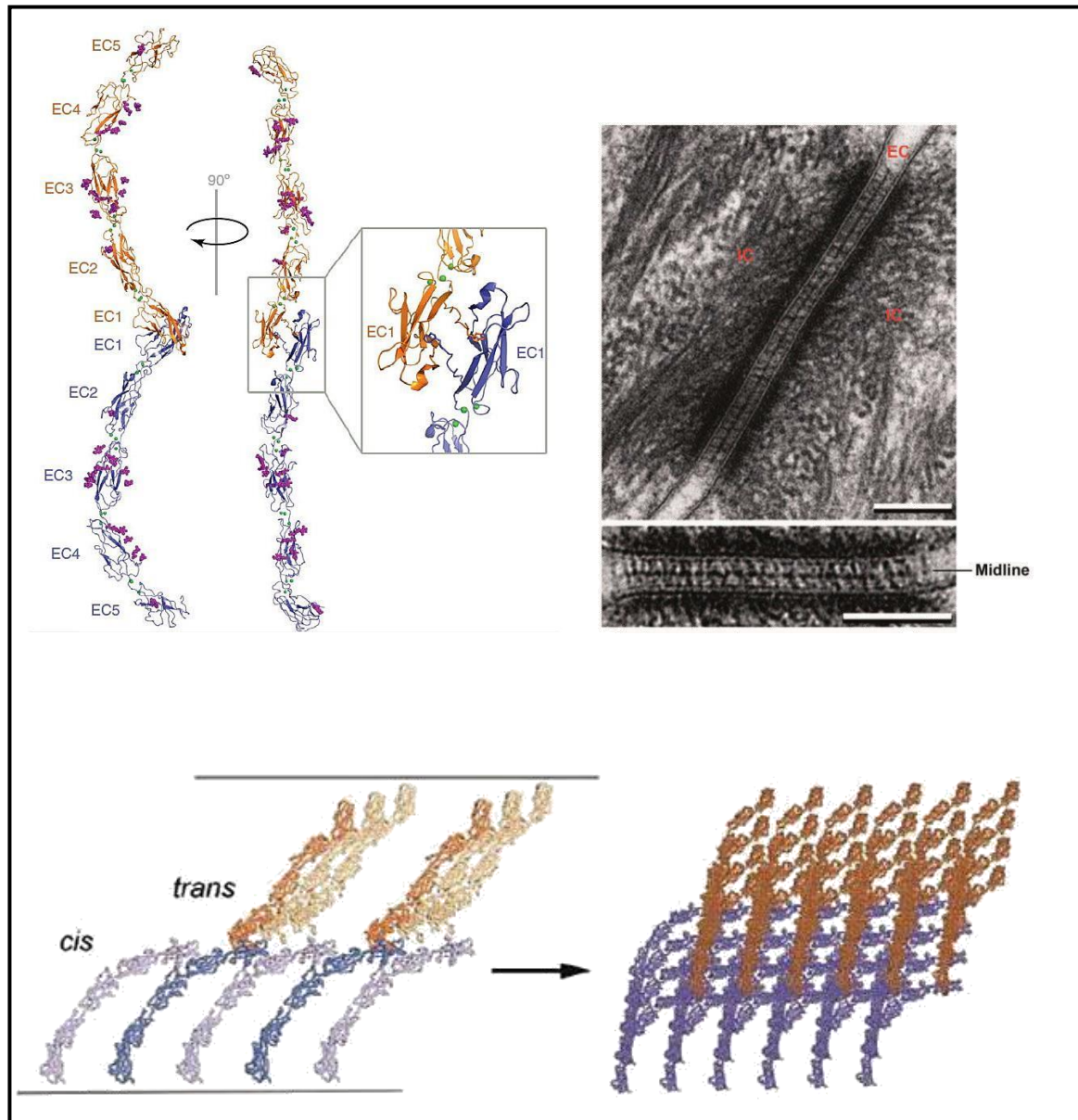


Figura 1-4-16: Arriba a la izquierda se observa la adhesión entre dos ectodominios de cadherina en el N-terminal de células opuestas, mostrándose el sitio de unión ampliado. Abajo se muestra de modo esquemático la unión *cis* entre cadherinas de la misma célula y la unión *trans* de cadherinas de células adyacentes y su representación en forma de clúster adhesivo. En la fotografía de *cryo-TEM*, arriba a la derecha, se observan las zonas de adhesión desmosomales (74; 75).

1.4.5. Física de la adhesión celular

Para entender los aspectos físicos de la adhesión celular, la física de la materia blanda aporta sistemas modelo de referencia de gran utilidad, como el mojado por gotas de un sustrato (76), la adhesión de vesículas con membranas fluidas ((51), éste es el método que se ha realizado en este trabajo) o la adhesión de cápsulas con una cubierta fina de polímero. El reto está en combinar estos sistemas de referencia con la molecularidad de procesos activos y específicos que la interfase célula-material es capaz de soportar. (77)

La mimetización de sistemas celulares desempeña un papel importante en la obtención de conocimientos sobre la base física de la adhesión celular y son perfectos para estudiar como la movilidad, densidad y topografía de las CAMs afecta a la formación de las uniones. Además, los efectos de la elasticidad de ambos, tanto del sustrato como de las células, el cual fluctúa y se deforma en un potencial que surge de las fuerzas interfaciales. La combinación de estos elementos produce un impacto en la energía de adhesión de los microdominios, afectando a la afinidad del complejo CAM aislado, pero también a los efectos cooperativos entre los sitios de unión, transmitidos por los componentes elásticos, así como a la respuesta termodinámica del sistema (78).

Las vesículas constituyen un sistema modelo definido para el estudio de los aspectos básicos de sistemas biológicos celulares más complejos.

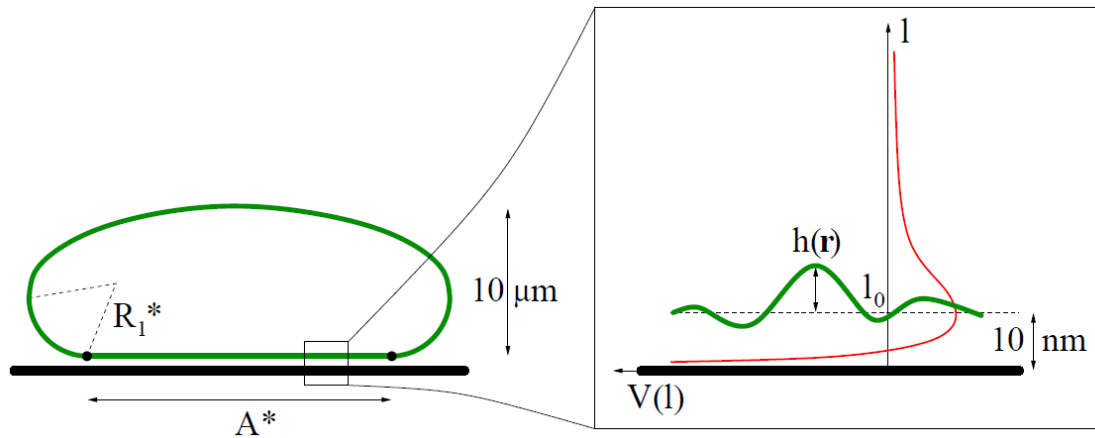


Figura 1-4-17: Adhesión de vesículas a un sustrato desde el punto de vista macroscópico con un área de contacto A^* y una curvatura de contacto de $1/R^*$. A la derecha, punto de vista mesoscópico donde se observa la zona de unión fluctuante con un potencial $V(l)$ el cual tiene su mínimo típicamente aproximado en 10 nm sobre el sustrato. Imagen tomada de (79)

Desde un punto de vista macroscópico, el modelo mínimo adhesivo de una vesícula consiste en añadir una energía de adhesión a la energía de “bending”:

$$F_a = -W \cdot A^* \quad 1-22$$

Capítulo 1

Aquí, W es el potencial de contacto y A^* es el tamaño de la zona de adhesión con la que la vesícula se adhiere a la superficie. Tal potencial de contacto entra en la condición de contorno en el punto de contacto. En primer lugar, el ángulo de contacto es necesariamente π ya que cualquier curva cerrada tendría una energía curvatura infinita. Esto implica que la membrana se curva en una dirección solamente y $1/R_2^* = 0$ a lo largo de la línea de contacto. En segundo lugar, la curvatura de contacto obedece

$$1/R_1^* = (2W/\kappa)^{1/2} \quad 1-23$$

que se deriva de la minimización con respecto a la zona de contacto. Esta condición de contorno, la cual no depende del área de la vesícula, abarca todos los modelos de curvatura. Dependiendo tanto del tamaño de la vesícula,

$$R \equiv (A/4\pi)^{1/2}, \quad 1-24$$

Y de la fuerza del potencial de adhesión, W , ésta adhesión puede ser débil o fuerte. El factor crucial es la fuerza a escala del potencial de adhesión

$$\omega \equiv W \cdot R^2 / \kappa. \quad 1-25$$

Las formas típicas de adhesión se muestran en la Figura 1-4-18 donde cabe destacar los dos regímenes.

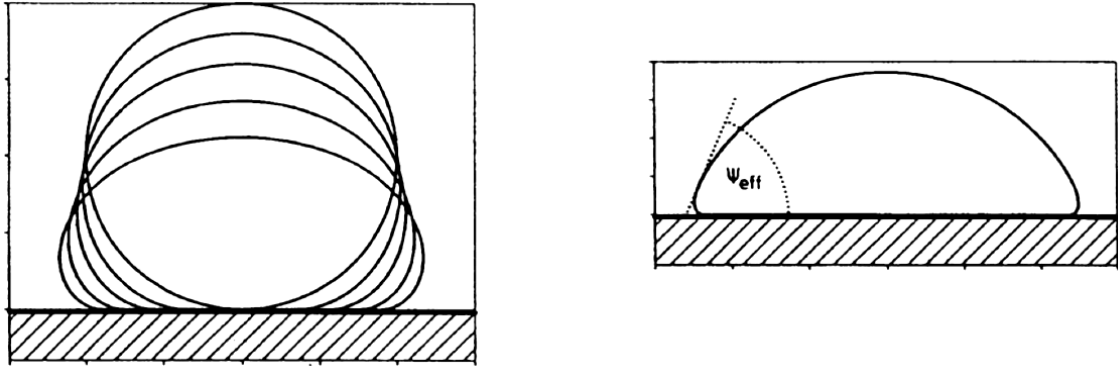


Figura 1-4-18 Formas calculadas de vesículas adheridas. A la izquierda se observa el régimen de adhesión débil; a la derecha el régimen de adhesión fuerte. Ésta última forma suele ser de tipo caperuza esférica con un ángulo de contacto efectivo ψ_{eff} . Imagen tomada de (79).

En una *adhesión débil* (ω es de orden 1), resulta que necesita el valor umbral de ω_c para que se produzca la adhesión. Si la fuerza de adhesión es muy pequeña, el posible aumento de la energía de adhesión es más pequeño que el coste en deformar a la vesícula por lo que no habrá adhesión en presencia de un sustrato adhesivo débil. El valor específico de ω_c depende del volumen reducido. Para $\omega > \omega_c$, la vesícula se adhiere. El área de contacto A^* aumenta con el aumento de la fuerza del potencial W .

En una *adhesión fuerte* ($\omega \gg 1$), la energía de adhesión resulta irrelevante y la forma se determina exclusivamente mediante la maximización del área de contacto A^* para dar un área total y un volumen cerrado. La forma óptima es cuando tiene forma de casquete esférico con un ángulo de contacto efectivo Ψ_{eff} determinado por las constantes geométricas. Los casos límite son cuando $\Psi_{eff} = \pi$ para una esfera ($v = 1$) y $\Psi_{eff} = 0$ para una forma plana ($v = 0$). Es interesante que este ángulo de contacto obedece la ecuación de Young,

$$1-26 \quad W = \sigma(1 + \cos \Psi_{eff})$$

A diferencia de la adhesión de las gotas de líquidos donde σ significa tensión superficial, para la adhesión de una vesícula no es una cantidad independiente pero viene dada por un valor numérico dado por el multiplicador de Lagrange usado para implementar la restricción de área. Como muestra la ecuación 1-26, σ es función tanto del volumen reducido (a través de $\Psi_{eff}(v)$) y de la fuerza de adhesión W .

Experimentalmente, la diferencia entre una adhesión fuerte y una débil se ha visto claramente. Mediante microscopía óptica (80), la interacción entre dos vesículas se ha estudiado y se han encontrado grandes regiones de contacto que corresponden a una adhesión débil. Las configuraciones tipo casquete se han observado en experimentos de micropipetas (81) así como en microscopía electrónica de criofractura para vesículas pequeñas (82).

En este trabajo se han realizado experimentos de adhesión fuerte entre vesículas añadiendo para ello, las cadherinas como material adhesivo.

1.5 CITOESQUELETO EUCARIOTA: CÓRTEX DE ACTINA

La capacidad de las células eucariotas de adoptar una gran variedad de formas y llevar a cabo movimientos direccionales y coordinados depende de una red muy compleja de filamentos direccionales y coordinados a través del citoplasma. Esta red recibe el nombre de citoesqueleto y es una estructura sumamente dinámica que se reorganiza continuamente mientras la célula cambia de forma, se divide, y responde a su entorno. Está formado por tres tipos de estructuras bien definidas: los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, que en conjunto forman una red interactiva y cada una de estas estructuras posee proteínas asociadas características.

Los microtúbulos son cilindros largos y huecos, cuya pared es un polímero compuesto de subunidades globulares. Cada subunidad globular consta de una sola molécula de tubulina. Son largos, rectos y rígidos y típicamente disponen de un extremo unido a un centro organizador de microtúbulos llamado centrosoma (53).

Los filamentos intermedios son un grupo de estructuras químicas heterogéneas, sometidas a importantes tensiones mecánicas. A diferencia de los microtúbulos, son polímeros de proteínas fibrosas muy alargadas con una cabeza amino terminal y una cola carboxilo terminal, con un dominio central a modo de varilla compuesto por una extensa región de hélice α (2).

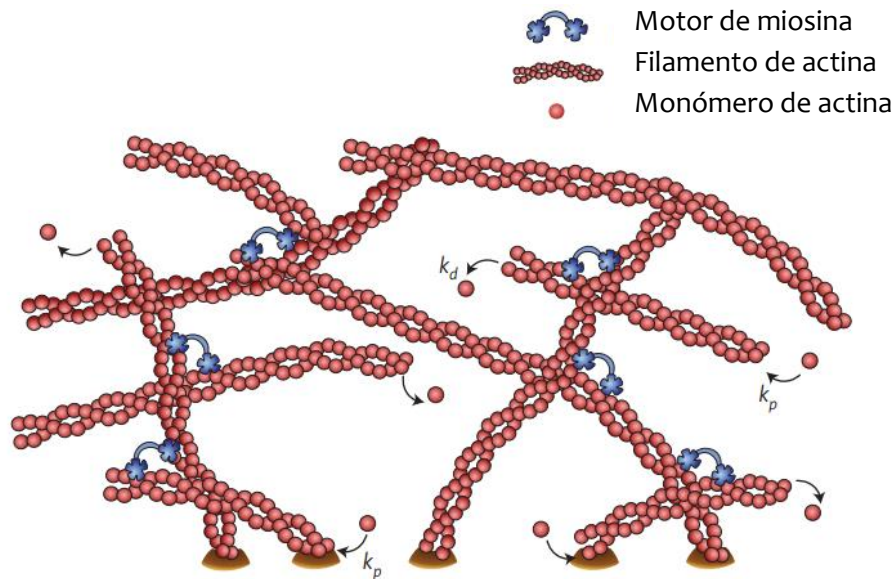


Figura 1-5-19: Ilustración de un gel activo formado por filamentos de actina, motores de miosina y entrecruzamientos pasivos (no mostrado). Los procesos de polimerización y despolimerización se indican con las siglas k_p y k_d . Imagen modificada de (83).

Los microfilamentos o filamentos de actina son hebras de unos 7 nm de diámetro, formados por una apretada hélice de monómeros de actina orientados uniformemente. La subunidad de actina es una cadena polipeptídica con estructura globular (G-actina). Cada subunidad de actina tiene un sitio de unión para un nucleótido, en su caso ATP (o ADP). Como la tubulina, el ensamblado de la actina es del tipo “cabeza-cola” para la generación de filamentos con distinta polaridad estructural. Los filamentos de actina están considerados como dos protofilamentos paralelos que se enrollan mutuamente en hélice hacia la derecha. La orientación paralela regular de estas subunidades otorga a la actina una polaridad estructural (2; 17).

1.5.1. Estructura

La **actina**, una proteína universal de los eucariotas, es el constituyente principal de los filamentos delgados. En disoluciones de baja fuerza iónica, la actina es un monómero, llamado G – actina a causa de su forma globular. A medida que se aumenta la fuerza iónica hasta el nivel fisiológico, la G – actina polimeriza en una forma fibrosa llamada F – actina, que se parece mucho a los filamentos delgados del músculo intacto. La actina, al igual que la miosina, es una ATPasa. Sin embargo, la hidrólisis del ATP debida a la actina no provoca la contracción muscular. El ciclo ATP-ADP de la actina participa más bien en la formación y destrucción de los filamentos (84).

Wolfgang Kabsch y Kenneth Holmes resolvieron la estructura tridimensional de las estructuras individuales de actina en 1990. La G-actina es una proteína globular con 375 aminoácidos (43 kD). Cada monómero de actina tiene sitios de unión muy juntos que hace que, mediante las interacciones “cabeza-cola” con otros monómeros de G-actina, polimericen para dar lugar a filamentos de actina (F – actina). El ATP (o el ADP) se une a una hendidura localizada entre los dos dominios del monómero. En la F – actina, cada monómero se orienta respecto al siguiente mediante un giro de 166° y un desplazamiento de 27,5 Å, lo que le confiere el aspec-

to de una doble hebra. De hecho, en las micrografías electrónicas los filamentos delgados se parecen a dos collares de perlas enrollados entre sí. En el filamento, cada monómero está en contacto con otros cuatro, lo que explica el alto grado de cooperatividad de la polimerización. Cuando los monómeros de actina alcanzan la concentración crítica comienza el ensamblaje de los filamentos; siendo este valor 20 veces menor para la ATP-actina que para la ADP-actina (85; 86).

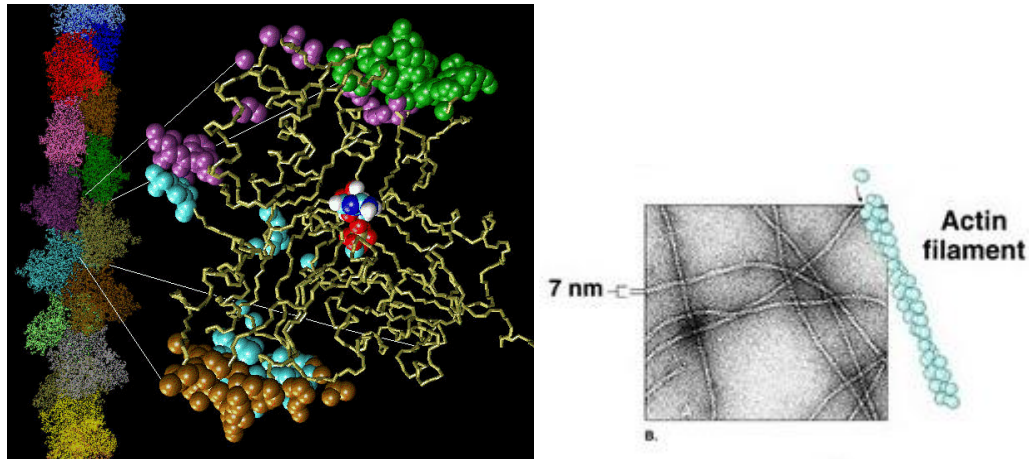


Figura 1-5-20: Estructuras de la actina en la forma globular (G – actina) y fibrilar (F – actina). *Imagen izquierda*, Al fondo se observa la disposición de los monómeros de actina formando el filamento con forma de hélice dextrógira. El giro se repite cada 37 nm y todas las subunidades tienen la misma orientación, en la ampliación, se observa el monómero de actina con el nucleótido (ATP o ADP) unido en el centro de la molécula. *Imagen derecha*, micrografía electrónica de los filamentos de actina con tinción negativa.

1.5.2.Polimerización

El ensamblaje de los filamentos de actina se puede estudiar *in vitro* mediante la regulación de la fuerza iónica de disoluciones de actina (85). En disoluciones de baja fuerza iónica, los filamentos de actina despolimerizan dando lugar a monómeros. Si la fuerza iónica del medio aumenta, los monómeros de actina polimerizan espontáneamente.

El primer paso en la polimerización de la actina es la nucleación. En ella se comienzan a formar pequeños agregados formados por la unión de dos o tres monómeros de actina. A partir de ese momento, los filamentos de actina son capaces de crecer mediante la adición reversible de monómeros en ambos extremos, siendo el “extremo más” del orden de 5-10 veces más rápido que el “extremo menos”. Los monómeros de actina siempre se unen en presencia de ATP, el cual se hidroliza a ADP siguiendo la dirección de ensamblaje.

Debido a que la polimerización es reversible, los filamentos pueden despolimerizar mediante la disociación de las subunidades de actina, es decir, los filamentos de actina tienen la capacidad de disociarse cuando es necesario para la célula. Es por ello que existe un equilibrio aparente entre los monómeros y filamentos de actina, el cual depende de la concentración de monómeros libres que exista en el medio. La proporción de monómeros de actina que se incorporan a los filamentos es proporcional a su concentración, por lo que existe una concentración crítica de monómeros de actina en la cual, el grado de polimerización es igual al grado de disociación. A esta concentración crítica los monómeros y filamentos están en un equilibrio

Capítulo 1

aparente. La formación de nuevos filamentos es posible porque existen complejos proteicos denominados Arp2/3 que actúan como centros nucleadores. Esto es tremendamente útil para la célula puesto que permite crear nuevos filamentos allí donde se necesitan.

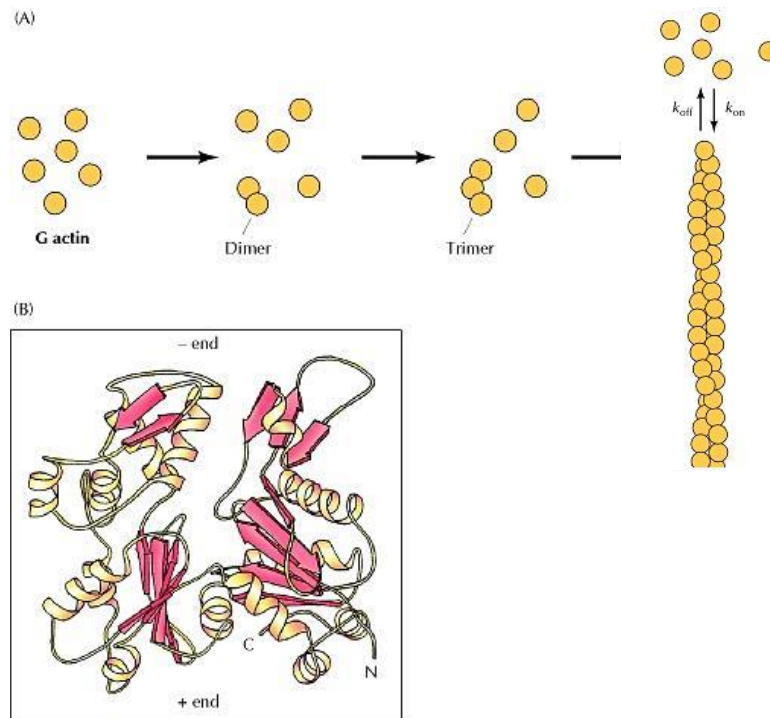


Figura 1-5-21: A) Etapas en la polimerización de la actina, desde la G-Actina a la F-Actina. Se puede observar que la polimerización es un proceso reversible regulado por constantes cinéticas. B) Dibujo de la estructura de un monómero de actina.

Existen ciertos factores que condicionan la acción de estas proteínas moduladoras, como la variación en la concentración de calcio, proteínas como las Rho-GTPasas, la presencia de lípidos o la mayor o menor expresión génica de sus ARN mensajeros. También hay fármacos que afectan a la polimerización de los filamentos de actina. Por ejemplo, las *citocalasinas* impiden la polimerización y las *faloidinas* impiden la despolimerización.

Como ya se ha comentado, los extremos (más y menos) tienen distintas velocidades de crecimiento, siendo más rápida la adición de monómeros en el extremo de crecimiento rápido (más) que en el extremo de crecimiento lento (menos). Al ser más lenta la disociación del complejo ATP-actina que el complejo ADP-actina, se traduce en una diferencia en la concentración crítica de monómeros necesarios para la polimerización en los dos extremos. Esta diferencia da como resultado el fenómeno conocido como “treadmilling”[‡], el cual ofrece un comportamiento dinámico de los filamentos de actina (Figura 1-5-22). Este fenómeno es dependiente de ATP. Mientras que el papel del treadmilling en la célula no se ha llegado a entender, refleja la necesidad de la existencia de una polimerización y despolimerización dinámica de los filamentos de actina para que las células puedan tener movilidad y cambiar la forma si el sistema lo requiere.

[‡] El “treadmilling” es el movimiento equivalente que realiza una cinta de correr.

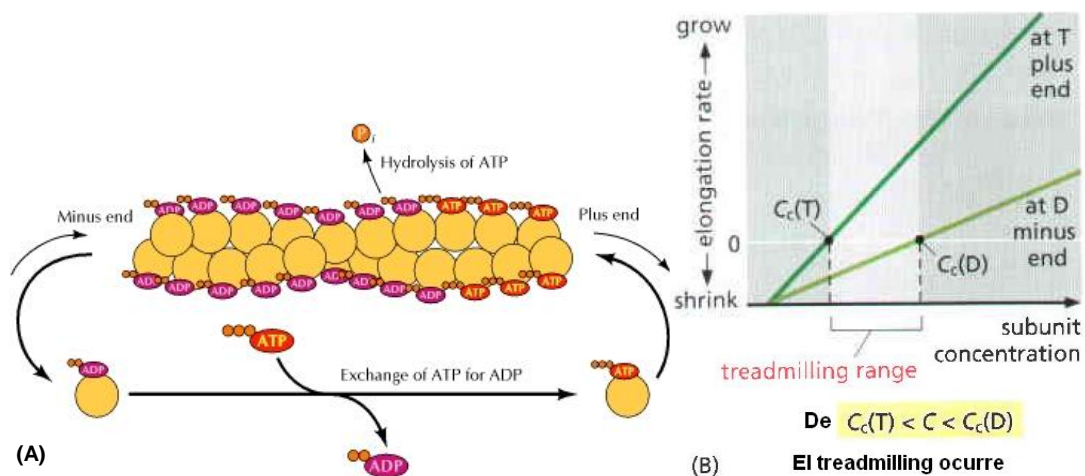


Figura 1-5-22 El “treadmilling” de los filamentos de actina, hace posible que, mediante la hidrólisis del nucleósido trifosfato, se añada la siguiente subunidad. (A) Esquema gráfico del “treadmilling”. (B) El treadmilling sucede en el rango intermedio de concentraciones de subunidades libres. La concentración crítica de polimerización en el extremo final de un filamento con la forma T es menor que para la forma D. Si la concentración real se encuentra entre ambos valores, el “extremo más” crece mientras que el “extremo menos” se contrae, produciéndose el fenómeno del “treadmilling”.

Relación con la membrana plasmática

Los filamentos de actina tienen una alta concentración en la periferia de la célula, donde se encuentran formando una red tridimensional bajo la membrana. Esta red de filamentos de actina, junto con las proteínas de unión específicas es lo que dará la forma a la célula y se verá involucrado en una gran variedad de actividades celulares superficiales, incluido el movimiento. La asociación del citoesqueleto de actina con la membrana plasmática es, por lo tanto, el centro de la estructura y función celular.

La proteína que ofrece la base estructural para el citoesqueleto en los eritrocitos es la formación del complejo proteico actina-espectrina (en el siguiente epígrafe, se entrará en detalle al citoesqueleto del glóbulo rojo). (86)

1.6 ESQUELETO DE MEMBRANA DEL GLÓBULO ROJO

Existen sistemas celulares cuya membrana está específicamente reforzada con un esqueleto de membrana. La membrana citoplasmática del glóbulo rojo (eritrocito) es un modelo celular muy estudiado debido a que es una célula que carece de núcleo y orgánulos internos, convirtiéndolo en un sistema ideal para hacer un estudio de las propiedades físicas de una membrana compleja dotado con un esqueleto de membrana. La membrana sólo constituye el 1% en peso del eritrocito pero es fundamental para su funcionamiento. (89)

La membrana del eritrocito se distribuye en 3 capas: la capa central está constituida por una bicapa de lípidos y proteínas; la exterior está recubierta por una película de oligosacáridos y glicoproteínas y la tercera está en contacto con el medio intracelular que es la red de citoesqueleto (Figura 1-6-23).

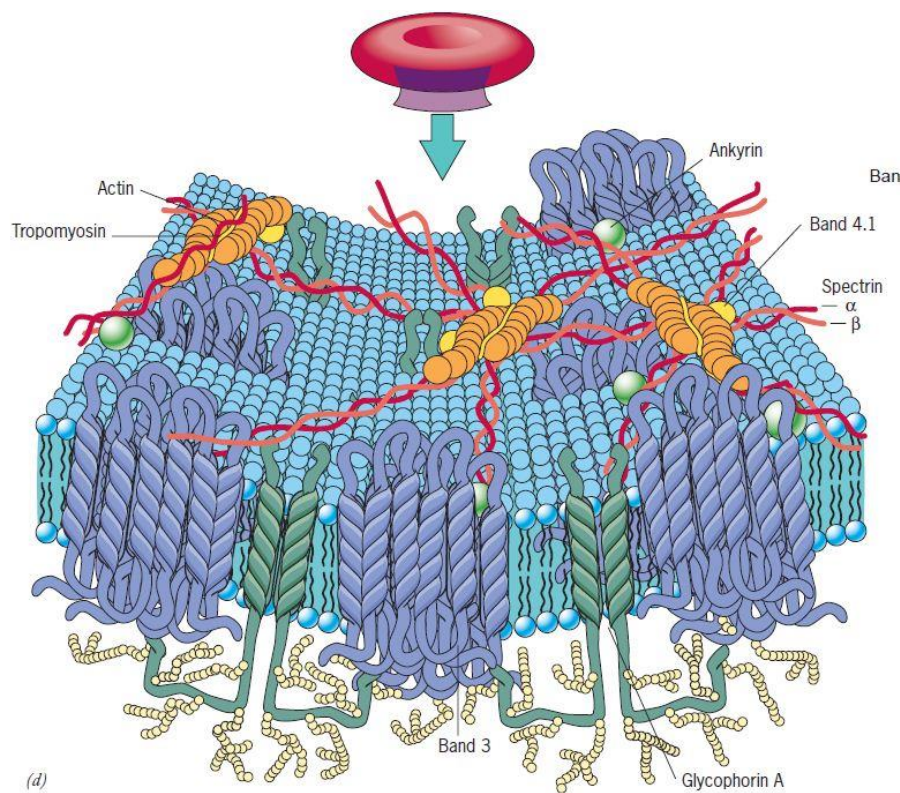


Figura 1-6-23: Imagen tomada del libro de Gerald Karp "*Cell and molecular biology concepts*". En ella se muestra el dibujo de la estructura de la membrana celular del eritrocito donde se observa la red de espectrina formada por las distintas proteínas implicadas (2).

Las principales funciones de la membrana son el transporte selectivo, procesos de obtención de energía a través de la glicólisis, transducción y ampliación de señales. La bicapa junto con el citoesqueleto proporciona flexibilidad y estabilidad mecánica.

El contenido total de lípidos de la membrana está constituido por un 60% de fosfolípidos, un 30% de colesterol y el resto por glicolípidos. Los principales fosfolípidos de la membrana son la PC, PE, SM, PS y otros minoritarios como PI, PA y L-PC (Figura 1-6-24).

La composición de la bicapa está íntimamente relacionada con la fluidez de la membrana. El grado de insaturaciones y el contenido y tipo de colesterol presente en la membrana, son determinantes en la fluidez de la bicapa lipídica. A mayor relación colesterol/fosfolípido las membranas son más fluidas, y el tipo de fosfolípido también afecta, será más fluida una membrana en presencia de PC y SM que no sólo PC.

Es conocido que en los eritrocitos la membrana es asimétrica, conteniendo el 96% y el 90% de PS y PE exclusivamente en la cara interna de la bicapa y a pH fisiológico los lípidos PA, PS y PE presentan carga neta negativa mientras que el resto de las moléculas son neutras (90; 91).

La presencia de PE y PS en la monocapa interna está involucrada con la interacción con el citoesqueleto.

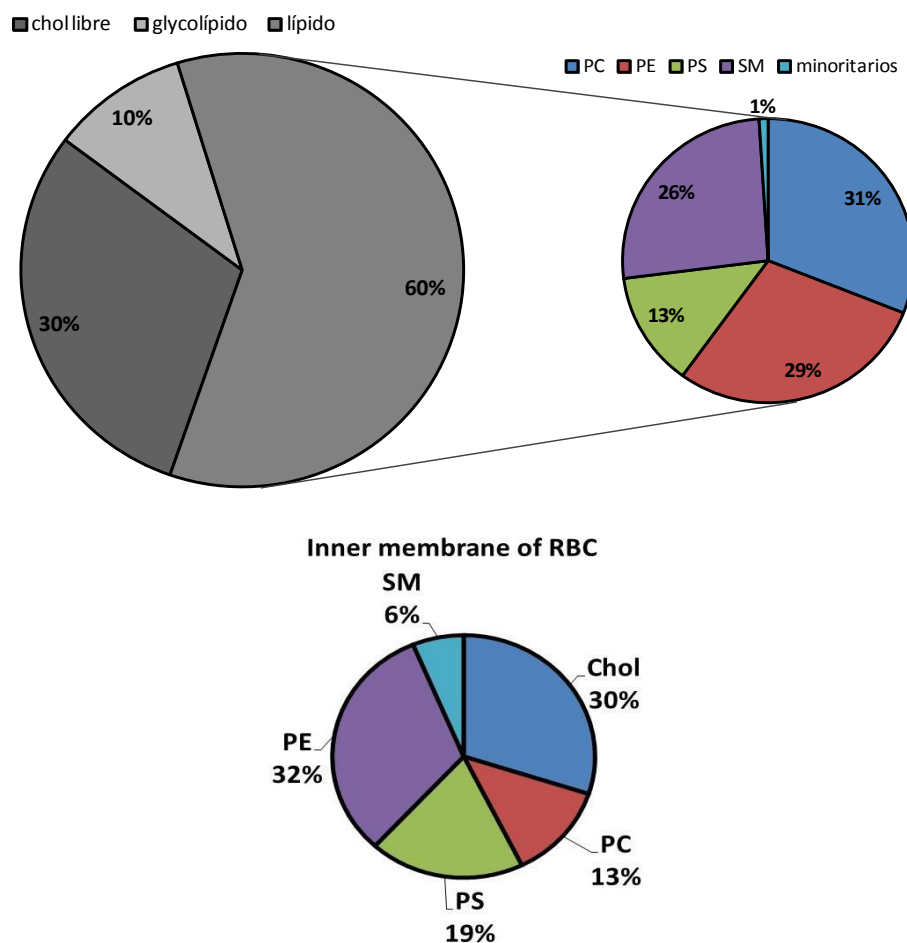


Figura 1-6-24: Arriba, gráficos representativos del porcentaje lipídico en la membrana del glóbulo rojo. Abajo, gráfico de las proporciones de lípido presentes en la *membrana interna* del glóbulo rojo.

Capítulo 1

Al estudiar las proteínas del eritrocito se observa que la espectrina, la glucoforina y la banda 3 constituyen el 60% en peso de las proteínas totales de la membrana. La espectrina constituye el mayor componente del entramado proteico que se extiende por el interior de la membrana celular. La espectrina es una barra larga y flexible cuya estructura molecular está compuesta por un herterodímero formado por dos grande subunidades estructuralmente similares, y se asocian cabeza con cabeza formando tetrámeros adquiriendo forma de ovillo en disolución. Las colas, entre 4 y 6 tetrámeros, se enlazan entre sí mediante la unión de filamentos cortos de actina y a otras proteínas de citoesqueleto como la proteína banda 4.1 con las que forma el complejo de unión. El resultado final es una red triangular deformable que se encuentra acoplada a la membrana lipídica mediante la anquirina y la banda 4.1. Esta red polimérica permite al eritrocito resistir el estrés que sufre su membrana a medida que es empujado a través de los estrechos capilares del sistema circulatorio. La red de citoesqueleto presenta una gran flexibilidad (92).

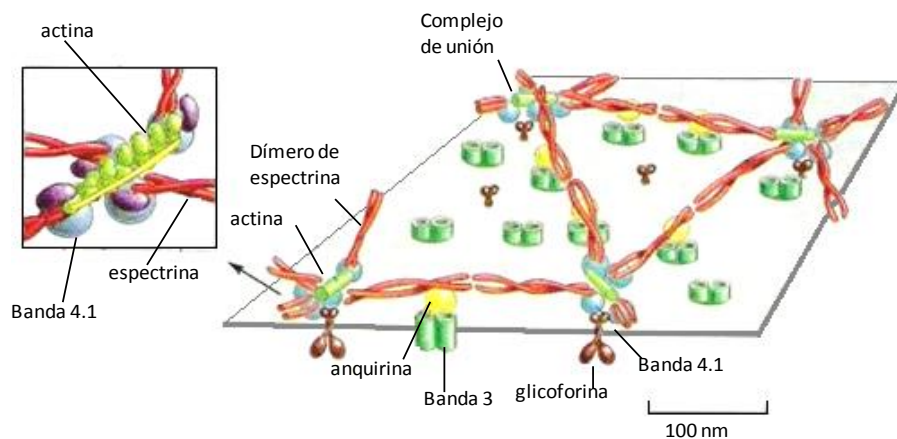


Figura 1-6-25: Estructura del citoesqueleto de espectrina del glóbulo rojo. En él se observan las distintas proteínas implicadas. (Imagen modificada de (53)).

En este trabajo nos proponemos estudiar diferentes aspectos físicos de las membranas biológicas, desde la estabilidad termodinámica hasta las propiedades de adhesión mediadas por cadherinas, pasando por la mecánica de las dos clases dos clases paradigmáticas de citoesqueleto asociado a membrana, el córtex de actina y el esqueleto de espectrina de la membrana del glóbulo rojo.

En el siguiente capítulo pasamos a enumerar los objetivos específicos.

REFERENCIAS

1. *Model membrane systems and their applications*. **Chan, Yee-Hung M. y Boxer, Steven G.** 2007, Current Opinion in Chemical Biology, Vol. 11, págs. 1-7.
2. **Karp, Gerald.** *Cell and molecular biology. Concepts and experiments*. United States of America : John Wiley & Sons, Inc, 2010.
3. **Sadava, D. E.** *Cell biology: organelle, structure and function*. s.l. : Jones and Bartlett Publishers, 1993.
4. *A contribution to the theory of permeability of thin films*. **Danielly, J.F. y Davson, H.** 4, s.l. : Journal of cellular and comparative physiology, 1935, Vol. 5, págs. 495-508.
5. **Weissmann, G. y Clairbone, R.** *Cell membranes: biochemistry, cell biology & pathology*. s.l. : HP Pub. Co., 1975.
6. *New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers*. **J.D.Robertson.** 6, s.l. : The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 1957, Vol. 3, págs. 1043-1048.
7. *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes*. **Singer, S. Jonathan y Nicolson, Garth.** 4023, s.l. : Science, 1972, Vol. 175, págs. 720-731.
8. *Refinement of the fluid-mosaic model of membrane structure*. **Israelachvili, J.N.** 469, s.l. : Biochim. Biophys Acta, 1977, págs. 221-225.
9. *Dynamic receptor superstructures at the plasma membrane*. **Damjanovich, S, Gáspár, R. Jr. y Pieri, C.** 30, s.l. : Q. Rev. Biophys, 1997, págs. 67-106.
10. *Revisiting the fluid mosaic model of membranes*. **Jacobson, K., Sheets, E.D. y Simson, R.** 268, 1995, Science, págs. 1441-1442.
11. *The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer-Nicolson model*. **Goñi, Félix M.** 6, 2014, Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1837, págs. 1467-1476.
12. *The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years*. **Nicolson, Garth L.** 6, 2013, Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1838, págs. 1451-1466.
13. **Deserno, Markus.** Fluid Lipid Membranes - a primer.
14. **Luckey, Mary.** *Membrane Structural Biology with biochemical and biophysical foundations*. New York : Cambridge University Press, 2008.
15. *From biological membranes to biomimetic model membranes*. **Eeman, Marc y Deleu, Magali.** 4, 2010, Biotechnol. Agron. Soc. Environ., Vol. 14, págs. 719-736.
16. **Gurr, Michael I., Harwood, John L. y Frayn, Keith N.** *Lipid Biochemistry*. Oxford : Blackwell Science , 2002.

Capítulo 1

17. **Yeagle, Philip L.** *The structure of biological membranes*. s.l. : CRC Press, 2005.
18. **P.L.Yeagle.** 267, 1987, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 822.
19. **Ipsen, J.H., Mouritsen, O.G. y Zuckermann, M.J.** 661, 1989, *Biophysical Journal*, Vol. 56.
20. **Finegold, L.X.** *Cholesterol and Membrane Models*. Boca Raton FL : CRC Press, 1993.
21. *Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle*. **Lingwood, Daniel y Simons, Kai.** 46, 2010, *Science*, Vol. 327, págs. 46-50.
22. *On the mechanism of vesicle formation*. **Lasic, D.D. y martin, F.J.** 2, 1990, *Journal of Membrane Science*, Vol. 50, págs. 215-222.
23. *Negative staining og phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope*. **Bangham, A.D. y Horne, R.W.** 5, 1964, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 8, págs. 660-670.
24. *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. **Bangham, A.D., Standish, M.M. y Watkins, J.C.** 1, 1965, *Journal of Molecular Biolog*, Vol. 13, págs. 238-252.
25. *Spontaneous vesiculation of phospholipids:a simple and quick method of forming unilamellar vesicles*. **Hauser, H. y Gains, N.** 6, 1982, *PNAS*, Vol. 79, págs. 1683-1687.
26. *Liposome preparation and size characterization*. **Woodle, M.C. y Papahadjopoulos, D.** 1989, *Methods Enzymol.*, Vol. 171, págs. 193-217.
27. *Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics*. **Huang, C.H.** 1, 1969, *Biochemistry*, Vol. 8, págs. 344-352.
28. *Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simle preparative and semiquantitative technique*. **Hamilton, R.L.** 8, 1980, *Journal of Lipid Research*, Vol. 21, págs. 981-992.
29. *Size analysis of phospholipid vesicle preparations*. **Nozaki, Y., Lasic, D. y Tanford, J.** 4557, 1982, *Science*, Vol. 217, págs. 366-367.
30. *Larrge volume liposomes by an ether vaporization method*. **Deamer, D. y Bangham, A.D.** 2, 1976, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 443, págs. 629-634.
31. *Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation*. **Szoka, F. y Papahadjopoulos, D.** 9, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 75, págs. 4194-4198.
32. *Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles*. **Reeves, J.P. y Dowben, R.M.** 1, 1969, *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 73, págs. 49-60.
33. *Water permeability of phospholipid vesicles*. **Reeves, J.P. y Dowben, R.M.** 1, 1970, *The Journal of Membrane Biology*, Vol. 3, págs. 123-141.

34. *Rapid preparation of giant unilamellar vesicles*. **Moscho, A. et Al.** 21, 1996, Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 93, págs. 11443-11447.
35. *Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications*. **Angelova, M.I. et al.** 1992, Trends in Colloid and Interface Science VI, págs. 127-131.
36. **Méléard, P., Bagatolli, L.A. y Pott, T.** Giant Unilamellar Vesicle Electroformation: From Lipid Mixtures to Native Membranes Under Physiological Conditions. [ed.] D. Nejat. *Methods in Enzymology*. s.l. : Academic Press, 2009, 9, págs. 161-176.
37. *The mechanism of vesicle formation*. **Lasic, D.D.** 256(1), 1988, Biochemical Journal, Vol. 15, págs. 1-11.
38. *Fluid Vesicles*. **Seifert, U.** 2004, Lecture notes, 37th Spring School.
39. **Jones, Malcolm N. y Chapman, Dennis.** *Micelles, monolayers and biomembranes*. New York : Wiley-Liss, Inc., 1995.
40. *Liquid-expanded to liquid-condensed transition in lipid monolayers at the air/water interface*. **Pallas, N.R. y Pethica, B.A.** 4, 1985, Langmuir, Vol. 1, págs. 509-513.
41. *Interpretation of Mechanochemical Properties of Lipid Bilayer Vesicles from the Equation of State or Pressure–Area Measurement of the Monolayer at the Air–Water or Oil–Water Interface*. **Feng, Si-shen.** 4, 1999, Langmuir, Vol. 15, págs. 998-1010.
42. *Bending undulations and elasticity of the erythrocyte membranes: effects of cell shape and membrane organization*. **Zeman, K., Engelhard, H. y Sackmann, E.** 4, 1990, European Biophysical Journal, Vol. 18, págs. 203-219.
43. **Boal, David.** *Mechanics of the Cell*. Segunda edición. United Kingdom : Cambridge University Press, 2012.
44. **Sackmann, E.** Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles. *Handbook of Biological Physics*. s.l. : Elsevier Science B.V., 1995, Vol. 1, 5, págs. 213-303.
45. **Lipowsy, R.** Vesicles and Biomembranes. *Encyclopedia of Applied Physics*. 1998, Vol. 23, págs. 199-222.
46. **Spivak, M.** *A Comprehensive Introduction to Differential Geometry*. s.l. : Publish or Perish, Inc, 1975.
47. *Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments*. **Helfrich, W.** 11, 1973, Z. Naturforsch, Vol. 28, págs. 693-703.
48. *Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes*. **Helfrich, W. y Servuss, R.M.** 1, 1984, Il Nuovo Cimento D., Vol. 3, págs. 137-151.
49. *Dynamic simulations of membranes with cytoskeletal interactions*. **Lin, L.C. y Brown, F.L.** 1, 2005, Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys., Vol. 72, pág. 19.

Capítulo 1

50. *Hybrid simulations of lateral diffusion in fluctuating membranes*. **Reister-Gottfried, E., Leitenberger, S.M. y Seifert, U.** 1, 2007, Physical Review E, Statical, Nonlinear and Soft Matter Physics, Vol. 75, págs. 119-208.
51. *Configurations of Fluid Membranes and Vesicles*. **Seifert, U.** 1997, Max-Planck-Inst. für Kolloid- und Grenzflächenforschung.
52. *Fluid membranes in hydrodynamic flow fields: Formalism and an application to fluctuating quasispherical vesicles in shear flow*. **Seifert, U.** 3, 1999, The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems, Vol. 8, págs. 405-415.
53. **Alberts, Bruce, y otros, y otros.** *Molecular Biology of the Cell*. 5. s.l. : Garland Science, 2008.
54. *A bigger picture: classical cadherins and the dynamic actin cytoskeleton*. **Yap, Aparna Ratheesh and Alpha S.** 2012, Nature Reviews - Molecular Cell Biology, Vol. 12, págs. 673-679.
55. *Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis*. **Gumbiner, Barry M.** 1996, Cell, Vol. 84, págs. 345-357.
56. *Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis*. **Gumbiner, Barry M.** 2005, Nature Reviews - Molecular Cell Biology, Vol. 6, págs. 622-634.
57. *Three Functions of Cadherins in Cell Adhesion*. **Jean-Léon Maître, Carl-Philipp Heisenberg.** 2013, Current Biology, Vol. 23, págs. 626-633.
58. *A new crystal structure, calcium dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation*. **Pertz, Olivier, y otros, y otros.** 7, 1999, The EMBO Journal, Vol. 18, págs. 1738-1747.
59. *Cadherin Mechanics and Complexation: The Importance of Calcium Binding*. **Lavery, Fabien Cailliez and Richard.** 2005, Biophysical Journal, Vol. 89, págs. 3895-3903.
60. *C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms*. **J. Boggon, et al.** 2002, Science, Vol. 296, págs. 1308-1313.
61. *Structure and binding mechanism of vascular endothelial cadherin: a divergent classical cadherin*. **Julia Brasch, Oliver J. Harrison, Goran Ahlsen, Stewart M. Carnally, Robert M. Henderson, Barry Honig, Lawrence Shapiro.** 1, 2011, Journal of Molecular Biology, Vol. 408, págs. 57-73.
62. *Cadherin dimers in cell-cell adhesion*. **Trojanovsky, Sergey.** 2005, European Journal of Cell Biology, Vol. 84, págs. 225-233.
63. *Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules*. **Nose, Akinao, Tsuji, Katsumi y Takeichi, Masatoshi.** 1, 1990, Cell, Vol. 61, págs. 147-155.
64. *Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains*. **Tomschy, A., Fauser, C., Landwehr, R., Engel, J.** 1996, EMBO J., Vol. 15, págs. 3507-3514.

65. *The molecular architecture of cadherin in native epidermal desmosomes.* **Ashraf Al-Amoudi, Daniel Castaño Díez, Matthew J. Betts and Achilleas S. Frangakis.** 6, 2007, *Nature*, Vol. 450, págs. 832-839.
66. *Untangling Desmosomal Knots with Electron Tomography.* **Wanzhong He, et al.** 109, 2003, *Science*, Vol. 302, págs. 109-113.
67. *Characterizing the Initial Encounter Complex in Cadherin Adhesion.* **Sivasankar, Sanjeevi, y otros, y otros.** 8, 2009, *Structure*, Vol. 17, págs. 1075-1081.
68. *E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components.* **Kim, Nam-Yum, y otros, y otros.** 29, 2011, *PNAS*, Vol. 108, págs. 11930–11935.
69. **Chien Peter Chen, Shoshana Posy, Avinoam Ben-Shaul, Lawrence Shapiro, and Barry H. Honig.** 24, 2005, *PNAS*, Vol. 102, págs. 8531-8536.
70. *Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins.* **L. Shapiro, et al.** 23, 1995, *Nature*, Vol. 374.
71. *Cooperativity between trans and cis interactions in cadherin-mediated junction formation.* **Yinghao Wua, Xiangshu Jina, Oliver Harrison, Lawrence Shapiro, Barry H. Honig, and Avinoam Ben-Shaul.** 41, 2010, *PNAS*, Vol. 107, págs. 17592–17597.
72. *Two-step adhesive binding by classical cadherins.* **O.J. Harrison, et al.** 2010, *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. 17.
73. *Cadherin-mediated cell–cell adhesion: sticking together as a family.* **Saurabh D Patel, Chien Peter Chen, Fabiana Bahnay, Barry Honig and Lawrence Shapiro.** 2003, *Current Opinion in Structural Biology*, Vol. 13, págs. 390-398.
74. *Mechanism of homophilic cadherin adhesion.* **Leckband, Deborah y Sivasankar, Sanjeevi.** 2000, *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 12, págs. 587-592.
75. *The Extracellular Architecture of Adherens Junctions Revealed by Crystal Structures of Type I Cadherins.* **O.J. Harrison, et al.** 2011, *Structure*, Vol. 19, págs. 244-256.
76. *Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion.* **Julia Brasch, Oliver J. Harrison, Barry Honig and Lawrence Shapiro.** 6, 2012, *Trends in Cell Biology*, Vol. 22, págs. 299-310.
77. *Wetting: statics and dynamics.* **Gennes, P.G. De.** 3, 1985, *Reviews of Modern Physics*, Vol. 57.
78. *Physics of adherent cells.* **U. S. Schwarz and S. Safran.** 2013, *Reviews of Modern Physics*.
79. *Physics of Cell adhesion: some lessons from cell-mimetic systems.* **Smith, Sackmann and A.** 2014, *Soft Matter*.
80. *Physics meets Biology. From Soft Matter to Cell Biology: Fluid vesicles.* **Seifert, U.** 2004, *Lecture Notes*.

Capítulo 1

81. *Mutual adhesion of lecithin membranes at ultralow tensions.* **Helfrich, R.M. Servuss and W.** 1989, Journal de Physique, Vol. 50, págs. 809-827.
82. *Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes.* **E. Evans, W. Rawicz.** 1990, Physical Review Letters, Vol. 64, pág. 2094.
83. **S. M. Bailey, S. Chiruvolu, J. N. Israelachvili, J. A. N. Zasadzinski.** 1990, Langmuir, Vol. 6, pág. 1326.
84. *Active gel physics.* **Prost, J.** 2015, Nature Physics, Vol. 11, págs. 111-117.
85. *Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end.* **Narita, A., Oda, T. y Maeda, Y.** 2011, EMBO J., Vol. 30, págs. 1230-1237.
86. *Near-Atomic Resolution for One State of F-Actin.* **Vitold E. Galkin, Albina Orlova, Matthijn R. Vos, Gunnar F. Schröder, Edward H. Egelman.** s.l. : Cell Press, 2015, Structure, Vol. 23, págs. 1-10.
87. *Actin: protein structure and filament dynamics.* **Carlier, M.** 1991, J. Biol. Chem., Vol. 266, págs. 1-4.
88. *Surface-Induced Polymerization of Actin.* **Anne Renault, Pierre-François Lenne,*Cécile Zakri, Achod Aradian, Catherine Vénien-Bryan, François Amblard.** 1999, Biophysical Journal, Vol. 76, págs. 580–1590.
89. **G.M., Cooper.** *The Cell: A Molecular Approach.* Sunderland (MA) : Sinauer Associates, 2000.
90. **Yawata, Y.** *Cell Membrane: the Red Blood Cell as a model.* s.l. : WILEY-VCH, 2003.
91. *The Red Blood Cell: a comprehensive treatise.* **C. Bishop, D.M. Surgenor.** 1964, Academic Press.
92. *Lipids of Human Red Blood Cell Membrane: normal composition and variability in disease.* **Cooper, R.** 1970, Vol. 296.
93. **Sackmann, E.** Biological membranes: architecture and function. *Handbook of biological physics.* 1995, Vol. 1.
94. **Holmsen, Holm.** Nano UiB. [En línea] <http://nano.uib.no/Langmuir.php>.

CAPÍTULO 2:

OBJETIVOS

En el plano conceptual, la presente tesis doctoral está focalizada en el estudio de distintas proteínas asociadas a la membrana celular cuya estructura y dinámica son funcionales respecto a la mecánica de la membrana.

En este trabajo se realiza la reconstitución de proteínas en sistemas modelo para el estudio de sus funciones biológicas y de sus propiedades mecánicas asociadas a las membranas celulares. Desde un punto de vista metodológico, para el estudio de las propiedades mecánicas se emplearán distintas técnicas de caracterización como son la microscopía óptica y fluorescente, microscopía confocal y cryo-TEM, análisis de fluctuaciones de membrana y estudio de propiedades mecánicas empleando la balanza de Langmuir.

En esta tesis se realiza el estudio de tres tipos diferentes de proteína de membrana: cadherina, actina y espectrina, todas ellas relacionadas con el citoesqueleto.

La primera proteína de estudio es la **C-CADHERINA**, proteína perteneciente a una gran familia de proteínas de **adhesión celular** dependiente de calcio. Las cadherinas son unas proteínas con un dominio extracelular, mediante el cual se da lugar la adhesión intercelular, y un fragmento transmembrana unido a un complejo de cateninas mediante el cual interactúa con la red citoesquelética a través de los filamentos de actina. En esta tesis se realiza el estudio de las propiedades mecánicas de adhesión mediada por cadherinas a partir del ectodominio completo, es decir, sin fragmento transmembrana, construido en vesículas unilamelares como sistema modelo, resumido en los siguientes estudios:

- Energética del proceso adhesivo entre dos vesículas a partir de los ángulos de contacto y módulo de rigidez.
- Dinámica del contacto adhesivo entre dos vesículas.
- Reversibilidad del contacto adhesivo mediante fuerzas de tracción mecánica y tensión lateral de membrana ejercida con la técnica de manipulación de micropipetas.
- Microestructura del contacto adhesivo: formación de cremalleras de cadherina.

La siguiente proteína estudiada en esta tesis es la **ACTINA**, como constituyente básico y esencial del citoesqueleto eucariota, cuyos filamentos activos integran el entramado gelificado que constituye el **córtex celular**. Se realiza el estudio reológico de las propiedades mecánicas en sistemas modelo bidimensionales, monocapas de Langmuir, basados en actina mediante un doble abordaje experimental:

- Una interacción suave entre la proteína de citoesqueleto y la membrana sintética, debida a interacciones puramente electrostáticas;
- Una interacción fuerte en la que no solo tienen lugar interacciones electrostáticas, también hay una aportación covalente a través de un punto de anclaje específico.

La tercera proteína de estudio en esta tesis doctoral es la **ESPECTRINA**, proteína que forma la red bidimensional del **esqueleto de membrana** en el glóbulo rojo. Este estudio no

Capítulo 2

sólo se basa en las propiedades mecánicas de la proteína, sino también de los lípidos implicados con la misma, es decir, los presentes en la membrana interna del glóbulo rojo. Se realiza el estudio de:

- Reología de la membrana del glóbulo rojo mediante experimentos con monocapas de Langmuir (estudio 2D).
- Reconstitución del extracto de membrana en sistemas modelo basado en la composición lipídica de la membrana interna (estudio 3D).
- Diagrama de fases de los lípidos que constituyen la membrana interna del glóbulo rojo y efecto de la inserción del extracto de membrana en sus propiedades.

Cada uno de estos estudios contribuirá a arrojar información fundamental para poder alcanzar el **Objetivo Fundamental** de esta Tesis Doctoral: **La comprensión de la energética y los mecanismos que engendran la dinámica funcional del citoesqueleto celular, los cuales permiten el mantenimiento de un programa funcional de mecánica celular (software) que ejecutado a través de los elementos biomoleculares del citoesqueleto (hardware), posibilitan la funcionalidad mecánica de la célula.**

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se mostrarán las técnicas experimentales genéricas que se han empleado a lo largo de esta tesis doctoral

3.1. REACTIVOS EMPLEADOS

Los reactivos que se han empleado en este trabajo los dividimos en disoluciones tamponadas, lípidos empleados en los distintos experimentos, sondas de fluorescencia y proteínas.

3.1.1. Disoluciones tamponadas

Las disoluciones tampón empleadas se escogieron en función de los requerimientos de las distintas proteínas empleadas en este trabajo. Todos los reactivos empleados fueron cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl, 99.5%), cloruro de magnesio (MgCl_2), cloruro de níquel (NiCl_2), Tris-HCl, HEPES, cloruro de calcio (CaCl_2), sacarosa, glucosa, fosfato sódico (Na_3PO_4) y ATP (adenosín-5'-trifosfato), adquiridos en Sigma-Aldrich. Todas las disoluciones acuosas se llevaron a cabo en agua filtrada de calidad Milli-Q (Millipore®).

3.1.2. Lípidos

Los lípidos empleados en este trabajo fueron el *POPC* (1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, $M_w = 760.10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), *DOPC* (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, $M_w = 786.15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), *Chol* (colesterol $M_w = 386.66 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), *DPPE* (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina $M_w = 691.959 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), *POPS* (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (sal sódica), $M_w = 784.00 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), *DOGS-NTA* (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[(N-(5-amino-1-carboxipentil) ácido iminodiacético) succinil] (sal níquel (Ni^{2+})), de Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL), *DODA* (bromuro de dioctadecildimetilamonio, $M_w = 630.97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) de Kodak (Alemania). El lipopolímero funcionalizado con PEG (3-(N-succinimidiloxiglutaril)aminopropil, polietilenglicolcarbamil diestearoilfosfatidil-etanolamina; $M_w = 2996 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) abreviado como Sunbright® DSPE-020GS, lípido NHS, de NOF Corp. (Japón). Este lípido funcionalizado es una diestearoil fosfatidilcolina con una terminación con un grupo succinimida enlazado al fosfolípido mediante una unión PEG ($M_w = 2 \text{ kDa}$).[§]

En función de la necesidad de cada experimento se emplearán unos lípidos en concreto. En cada capítulo se especifica el tipo de lípido y composición del mismo.

3.1.3. Fluorescencia

Para el marcaje de lípidos en las membranas se emplearon las sondas fluorescentes rodamina-PE 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (*Rh-PE*) y NBD-PC (1-oleoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glicero-3-phosphocholine), fueron adquiridas de Sigma-Aldrich. La sonda fluorescente FM 143 se adquirió de Invitrogen Lipids. Estas sondas fluorescentes se disolvieron en cloroformo a una concentración de 1mg/mL y se almacenaron a -20°C .^{**}

El marcaje fluorescente de actina se realizó con un kit de maleimida (Invitrogen, Inc.). Se marcó fluorescentemente con Alexa-Fluor 350 C5 maleimida/Alexa-Fluor 350-succinimidil

[§] Ver anexo 1.

^{**} Ver anexo 1.

éster (NHS) que reaccionan específicamente con los sitios cisteína/lisina aminoácidos de las cadenas de proteínas. La actina se diluyó a una concentración de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelta en *G-buffer* e incubada toda la noche a 4°C en la oscuridad con una cantidad cercana a la equimolar de Alexa-maleimida/Alexa-NHS. La reacción de marcaje fue *quenched* mediante la adición de un exceso molar de unas 100 veces de cisteína/lisina para reaccionar con el fluoróforo que quedó sin reaccionar y terminar la reacción de marcaje. El fluoróforo que no había reaccionado se separó de la actina marcada fluorescentemente empleando una columna de separación PD10 con buffer (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De este modo, el marcaje fluorescente de actina (Alexa 350-actina) fue transferido al buffer con un 15 % de glicerol y se tomaron alícuotas de muestras que se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C . La concentración de la proteína ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y la eficiencia del marcado (62 % Alexa 350-actina y 7,8 % Alexa 488-actina) fue determinada espectroscópicamente (UV-Vis) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen; coeficientes de absorción: actina $46\,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 280 nm ; Alexa 350: $19\,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 346 nm , Alexa 488: $71\,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a 488 nm).

El marcaje fluorescente de la cadherina se realizó mediante Alexa Fluor® 488 anti-ratón, de Invitrogen Molecular Probes®, y con un anticuerpo monoclonal anti-HisTag, de GeneScript®, en presencia de la disolución tampona para el medio adhesivo con HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 1 mM, NiCl_2 1 mM pH 7.4.

3.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE MEMBRANA DE ERITROCITO (EME).

El extracto de glóbulo rojo se obtuvo a partir de sangre recién extraída de un donante sano y fue conservada en tubos en presencia de EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) para evitar su coagulación. Para poder obtener el extracto se siguió el protocolo de Steck y Kant (1), con alguna pequeña modificación para eliminar los restos de hemoglobina bajo condiciones de hemolisis.

El concentrado de eritrocitos se obtuvo mediante tres lavados consecutivos con una disolución tamponada de PBS (una parte de sangre/5 de PBS⁺⁺ (v/v); 150 mM de NaCl, 5 mM de fosfato sódico 5mM con un pH = 8.0). Una vez concentrados, se elimina el contenido citoplasmático bajo condiciones hemolíticas con un tampón hipotónico (1 extracto de eritrocito/40 tampón fosfato (v/v); 1 mM de sulfato de magnesio (MgSO_4), fosfato de sodio 5 mM, pH = 8). Los “fantasmas” de eritrocitos⁺⁺ se recuperaron tras la ultracentrifugación bajo las condiciones de 22000g, 10 minutos y 4°C , eliminando la fase inferior (pellet de color blanco), cuyo contenido es rico en proteasas, y recuperando el sobrenadante, que contiene los “fantasmas” de glóbulo rojo. Se repitió el lavado con el tampón fosfato en una rampa de dilución a pH = 8.0 constante (el primer tampón de lavado contenía 1mM de MgSO_4 , fosfato sódico 2.5 mM y el

⁺⁺ PBS \equiv phosphate-buffered saline o tampón fosfato salino.

⁺⁺ Se entiende como “fantasma” de glóbulo rojo o *RBC ghost*, como el glóbulo rojo que ha perdido todo el contenido interno y sólo mantiene la membrana celular con sus integrantes.

segundo tampón de lavado contenía 1mM de MgSO_4 y fosfato sódico 1.25 mM). Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C.

El extracto de membrana de eritrocito (EME) se obtuvo con una concentración final aproximada de 5 mg/mL. Obtenido dicho EME se realizó la vesiculación pasando el extracto de eritrocito que se encuentra en suspensión a través de una aguja de calibre (nº23) empleando una jeringa de 50 mL. El extracto de membrana de eritrocito se almacenó en alícuotas de 20 μL a -20 °C. (2)

3.3. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

3.3.1. Actina

La *actina* purificada, extraída del músculo de conejo, se conservó disuelta en una disolución tampón, específica a -20°C. Se emplearon dos tampones específicos dependiendo de la forma deseada de la actina (G = Globular, F = Fibrilar, Figura 3-1). El tampón de actina-G (*G-buffer*), a pH 7.4, contiene 2 mM Tris-HCl y 1 mM ATP. El tampón de actina-F (*F-buffer*), con pH 7.4, contenía 2 mM Tris-HCl, 1 mM ATP, 2 mM MgCl_2 y 100 mM KCl. La Actina se disolvió a una concentración de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

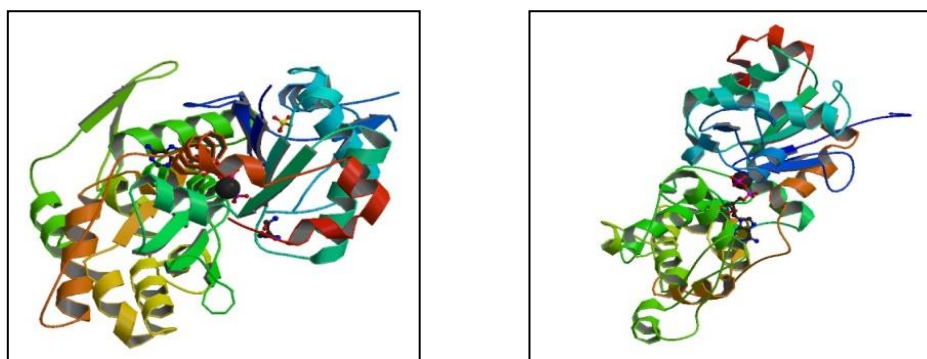


Figura 3-1 Estructura de la actina en forma globular (izquierda) y fibrilar (derecha) en estado nativo (*Obtenida de la base de datos PDB*)

Para poder realizar los estudios de la proteína se realizó un marcado fluorescente de la misma como se describe en el epígrafe anterior 3.1.3. Para el estudio de los efectos de la proteína en las membranas artificiales, la polimerización de la actina se indujo en presencia de MgCl_2 (2 mM) y KCl (100 mM). Según el protocolo de polimerización, la actina-G (preparada en el *G-buffer*), se inyecta como monómero en la cámara del experimento donde se mezcla con el *F-buffer* (polimerización a 20 °C). Para evitar la absorción de proteína inespecífica y la desnaturalización en interfaces que no pertenecen a la membrana (por ejemplo, aire/agua), la inyección de F- o G-actina puede ser realizada en presencia de la membrana lipídica.

3.3.2. Purificación de C-Cadherina

Para la obtención de la expresión ectodominio completo de la C-cadherina con un *tag* de Histidinas (Histag) en el C-terminal, se siguió el protocolo descrito por *Brieher et al* (3) y *Boggon et al* (4).

El plásmido pEE14 con la secuencia codificante para C-cadherina-His (Figura 3-2) contiene un mini gen codificante para la glutamina sintetasa, lo que permite la selección de células CHOK1 (células adherentes, crecen en el fondo de la placa) transfectadas con el plásmido en medio sin glutamina y con la adición de metionina sulfoximina (MSX, en determinadas concentraciones inhibe la glutamina sintetasa intrínseca de las células), por lo que sólo crecerán las células que han incorporado el plásmido. La proteína se expresa con un propéptido en el N-terminal que se procesa y la proteína madura se exporta al medio extracelular.

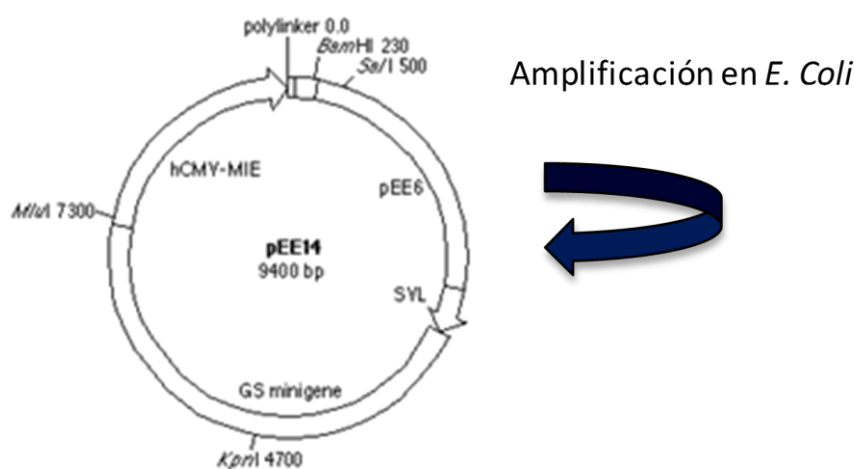


Figura 3-2: Plásmido de expresión con C-cadherina-His.

El plásmido (cedido por los autores del *Brieher et al*) se amplifica en *E.coli* y se purifica siguiendo un protocolo clásico de *maxiprep*. Se almacena en agua libre de endotoxinas (-20°C). La línea celular CHOK1 se cultiva (~10-14 días) hasta que se obtiene una confluencia ~80% en medio clásico DMEM/FBS (suero)/penicilina estreptomycin (PS).

La transfección se realiza en un volumen total de 150 ml de células en cultivo y se añade 1 mg de DNA puro. Se utiliza un reactivo de transfección lipofílico (Fugene 6). Tras 12-16 horas se cambia el medio por DMEM/F12/PS/MSX SIN FBS (estas condiciones severas forzarán a las células a expresar la proteína). Las células se pasan a unas placas especiales (Bioassays) con un volumen total de cultivo aproximado de 2 L (el medio no se cambia durante 10 días). El medio se recoge y centrifuga (descartando pellet de células muertas = flotantes), se añade azida (0.1 %) y se concentra con tubos Centricon Plus-70 (30,000 MWCO). El medio concentrado se diluye en una disolución tampón de purificación de afinidad de Co^{2+} (específico para el *His-tag* en C-terminal): 20 mM Hepes/150 mM NaCl/2 mM imidazol.

Se emplea la resina TALON para la purificación por afinidad. La elución se realiza con un tampón idéntico al de unión con 500mM imidazol como agente de elución. Realizada la elución, la proteína se concentra con filtros Centricon (10.000 MWCO) y se realizan varios pasos de ultrafiltración con un tampón final de 20 mM Hepes/150 mM NaCl/ 1 mM CaCl₂.

La proteína equilibrada en el mencionado tampón, se purifica adicionalmente por exclusión molecular en una columna HiLoad 16/60 y se recoge el pico onomérico (por volumen de elución) y se concentra hasta la concentración deseada en el tampón experimental (20 mM Hepes/150 mM NaCl/1 mM CaCl₂).

Tanto en geles teñidos con tinción de azul de Coomassie (Figura 3-3 izquierda) como en *Western – Blott* empleando como marcaje un anticuerpo anti-His-tag (Figura 3-3 derecha) se aprecia una pureza ~ 99%. La proteína tiene una masa nominal de 61kD, la cual aumenta por glicosilación hasta 74 kD. Se obtienen unos 60 mg de proteína pura.

Tanto las expresiones como las purificaciones de C-Cadherina fueron llevadas a cabo por el Dr. Javier Oroz y el Dr. Rubén Hervás, en el Instituto Ramón y Cajal.

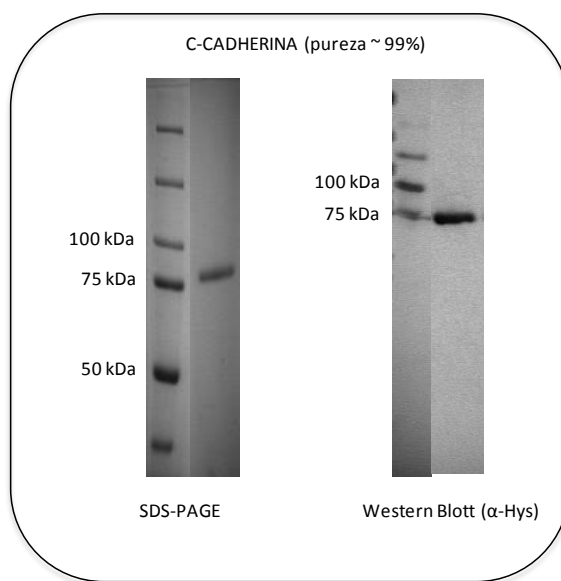


Figura 3-3 Fotografías de la obtención de proteína mediante SDS-PAGE (gel de electroforesis) y mediante la técnica de Western-Blott. A la izquierda se observa el gel teñido con azul de Coomassie y a la derecha se observa el marcaje con un anticuerpo anti-His-tag en un *Western – Blott*. En ambos ensayos bioquímicos se aprecia una pureza aproximada del 99%.

Una vez se obtuvo la proteína funcionalizada, se realizaron los experimentos de adhesión.

3.4. PREPARACIÓN DE MONOCAPAS

Para el estudio reológico de los lípidos se emplearon monocapas de Langmuir. Una aproximación experimental para el estudio las propiedades de equilibrio de estas monocapas es la obtención de isothermas Presión Superficial-Área, π -A, las cuales son el equivalente bidimensional de las isothermas p -V de un sistema en 3D.

Para los experimentos de reología de cizalla, se utilizó un reómetro oscilatorio (Physica MCR301, Anton Paar) equipado con una rotor bicónico (68,3 mm de diámetro, ángulo del cono 5°). El control de temperatura ($37 \pm 0,1$ °C) se realiza mediante un elemento Peltier asistido por un termostato externo del agua. El cono doble se puede colocar de forma muy precisa en la posición de interfaz a través de la medición de la fuerza normal presente en la superficie de la interfaz líquido / aire.

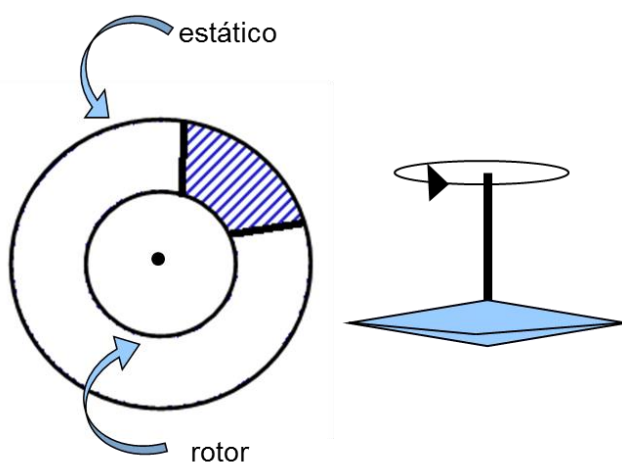


Figura 3-4: Dibujo esquemático del experimento de reología de cizalla. A la *izquierda* la vista aérea; a la *derecha* la vista lateral del rotor bicónico.

Para los experimentos de reología de compresión se empleó una balanza de Langmuir. Los experimentos se realizaron con un ordenador que controlaba la balanza de Langmuir con un área máxima de 270 cm² (NIMA, UK) equipada con Teflón (20 cm longitud, 7 cm de anchura, 5 cm de profundidad; V = 140 cm³) y unas barreras hidrofílicas (Delrin). La presión superficial de la monocapa (π) se mide con un papel de Wilhelmy atrapado con un sensor gravimétrico (PS4, NIMA). Se siguió el procedimiento según se describe en la referencia (5).



Figura 3-5: Balanza de Langmuir comercial, NIMA 702 BAM.

La balanza de Langmuir se empleó en dos de los capítulos de esta tesis: en el **capítulo 5** y en el **capítulo 6**.

En el **capítulo 5**, para la realización de los experimentos con la balanza de Langmuir, se emplearon los lípidos (70 % POPC, 20 % DODA y 10 % Sunbright), disueltos en cloroformo ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, contenido total de lípido) se dispersan gota a gota sobre la superficie acuosa, en este caso *F-buffer* (*disolución tamponada para la F – actina*). Tras la dispersión se forma una monocapa diluida que se deja unos 30 minutos, hasta el equilibrio. Las isothermas de compresión se grabaron bajo una compresión uniaxial simétrica desde un estado de monocapa diluida a una velocidad de compresión constante de $10 \text{ cm}^2\cdot\text{min}^{-1}$. Las proteínas se añadieron a la subfase mediante la inyección bajo la monocapa creada, es decir, en la superficie de Teflón. La temperatura es controlada mediante la recirculación de agua termostatzada de un criostato a través de una chaqueta hasta la parte inferior. Todo el dispositivo se encuentra encerrado en una caja de plexiglás con una atmósfera saturada de humedad. La temperatura se controla en el interior de la caja mediante una lámpara de infrarrojos conectada a un termómetro de contacto ajustado a la misma temperatura que la subfase acuosa.

El lípido se esparcido sobre el *F-buffer* y se equilibra a distintas presiones iniciales (a partir de $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ donde la monocapa está empaquetada para evitar la exposición al aire de la proteína y su eventual desnaturalización). Una vez estabilizada la monocapa a una presión dada, se inyecta la proteína en forma globular hasta alcanzar una concentración final, en el régimen diluido, de $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los experimentos se realizaron bajo un régimen lineal con variación de la frecuencia de oscilación ($0.02\text{-}1 \text{ s}^{-1}$). Se realizaron experimentos a distintas presiones superficiales ($\pi = 20\text{-}40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), pero se focaliza la atención sobre la $\pi \approx 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ya que es la presión estructuralmente equivalente a la de un empaquetamiento lipídico en una bicapa.

En el **capítulo 6**, para realizar el estudio reológico de la membrana del glóbulo rojo, se empleó como sistema de referencia una disolución de POPC (100 %) de 1 mg/mL disuelto en cloroformo, tanto en medio acuoso como en disolución tamponada, y se realizó el mismo procedimiento que el estudio de actina. Para realizar el estudio reológico del glóbulo rojo, se prepararon monocapas de POPC y en la subfase se inyectó EME, cuyo proceso de obtención está descrito en el *epígrafe 3.2*, en presencia de la disolución tamponada de composición NaCl 100 mM, glucosa 40 mM, Hepes 10 mM, MgCl_2 5 mM a pH = 7.4. Las isothermas se realizaron a concentración de ATP variable. Este proceso se detallará más adelante en el **capítulo 6**.

3.5. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS LIPÍDICAS (LUVs Y GUVs)

Los liposomas son vesículas cerradas, de forma esférica y dimensiones coloidales, en los cuales la bicapa de fosfolípidos capta parte del disolvente en el interior de dicha cápsula. En el caso de que una sola bicapa encapsule el medio acuoso se habla de vesículas unilamelares, y en el caso de que sean varias bicapas concéntricas se habla de vesículas multilamelares.

El tamaño de los mismos oscila entre los 20 nm hasta decenas de micras, y dependiendo del método de preparación se puede controlar, no solo el tamaño, sino también la composición química. Debido a sus propiedades físico-químicas, los liposomas tienen una gran variedad de aplicaciones al ser empleados como sistemas modelos para estudios de biofísica de membranas, fotofísica y fotoquímica, interacciones coloidales, función celular, transducción de señales, entre otros. Las aplicaciones industriales se encaminan hacia la vehiculización de fármacos en medicina, auxiliares de vacunación, amplificadores de señal e diagnóstico clínico y bioquímica analítica entre otros. En el campo de la ciencia básica, las membranas lipídicas son superficies bidimensionales contenidas en un espacio tridimensional, y debido a ello se emplean para realizar estudios de mecánica de membranas así como para entender los procesos como la permeabilidad, fusión, fisión, fluctuaciones de forma, comportamiento de fases de las membranas biológicas (6; 7).

Dependiendo del tamaño y estructura los liposomas pueden clasificarse según el tamaño, para vesículas formadas por una única bicapa lipídica en vesículas unilamelares pequeñas (*SUV*) cuyo tamaño es inferior a los 50 nm, vesículas grandes unilamelares (*LUV*), cuyo tamaño oscila entre los 50 nm y 100 nm y vesículas unilamelares gigantes (*GUV*), las cuales tienen tamaños mayores a 1 µm; pueden clasificarse en vesículas compuestas por varias bicapas lipídicas (vesículas oligolamelares – *OLV* – y vesículas multilamelares – *MLV* – que contienen varias bicapas concéntricas) y vesículas compuestas por multitud de vesículas distribuidas no concéntricas, en el interior de una vesícula de mayor tamaño (vesículas multivesiculares – *MVV*) (Figura 3-6).

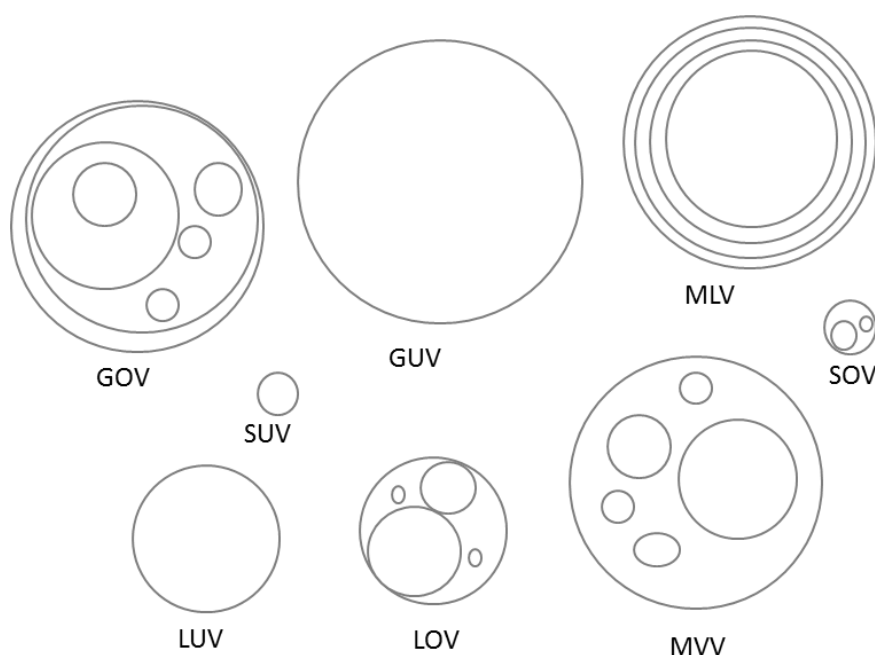


Figura 3-6: Representación esquemática de los tipos de liposomas en función de su tamaño y número de lamelas.

Abreviatura	Nombre	Tamaño
UL	Unilamelares	
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas	< 50 nm
LUV	Vesículas unilamelares grandes	50 – 100 nm
GUV	Vesículas unilamelares gigantes	> 100 nm
OLV	Oligolamelares	
SOV	Vesículas oligolamelares pequeñas	< 50 nm
LOV	Vesículas oligolamelares grandes	50 – 200 nm
GOV	Vesículas oligolamelares gigantes	> 1 μ m
MLV	Vesículas multilamelares	> 0.5 μ m
MVV	Vesículas multivesiculares	> 0.5 μ m

Tabla 3-1: Tabla sinóptica de los tipos de liposomas en función de tamaño y número de lamelas.

El empleo de *GUVs* se ha visto favorecido debido a que pueden observarse directamente con microscopía óptica, favoreciendo el estudio de parámetros universales e independientes de la escala, por ejemplo, el comportamiento mecánico, así como parámetros escalables a tamaños inferiores como la eficiencia de encapsulación, área superficial y debido a que el tamaño es similar al tamaño celular, lo que pueden emplearse como modelos celulares (8).

3.5.1.Preparación de LUVs

Las vesículas unilamelares grandes se preparan mediante la técnica de extrusión. Para ello se parte de una mezcla lipídica en un disolvente orgánico y se preforma una película lipídica mediante la evaporación del disolvente en condiciones de vacío. Una vez formada la película lipídica de composición deseada, se hidrata con la fase acuosa o medio tamponado, según sean las condiciones experimentales, y en este paso ya aparecen *MLVs*. Una vez han aparecido las *MLVs* se procesan según la especie que se desee obtener (2). En la presente tesis doctoral, se ha procedido a pasar las *MLVs* formadas en el proceso de hidratación a través de un filtro de policarbonato de tamaño de poro definido un número impar de veces provocando la ruptura y nueva conformación de vesículas hacia la producción de vesículas unilamelares con ayuda de un extrusor manual (7).

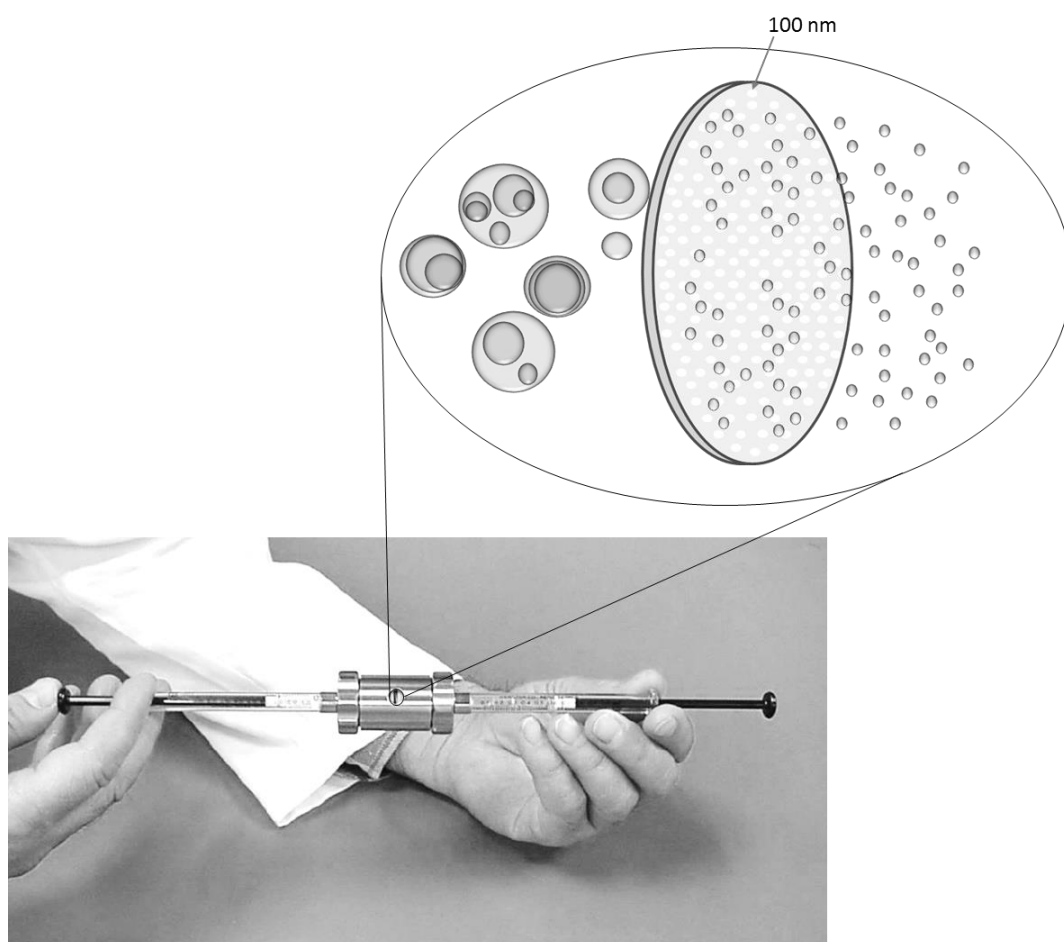


Figura 3-7: Representación esquemática de la formación de liposomas mediante la técnica de extrusión y fotografía del extrusor empleado (imagen obtenida de AVESTIN Liposofast Inc.)

3.5.2.Preparación de GUVs

Uno de los primeros métodos empleados para la preparación de vesículas gigantes fue descrito por Reeves y Dowben en 1969. Este método estaba basado en la hidratación controlada de una película de lípidos, pero tiene el inconveniente que la mayoría de las vesículas obtenidas son multilamelares y tan sólo un pequeño porcentaje son unilamelares. Hoy en día existen variedad de técnicas para la obtención de vesículas unilamelares gigantes como son:

- **Método 1:** electroformación, consiste en hidratar una película de lípido en presencia de un campo eléctrico.
- **Método 2:** mediante la estabilización de una emulsión agua/aceite.
- **Método 3:** mediante de la estabilización de la emulsión doble agua/aceite/agua.
- **Método 4:** mediante la fusión de SUVs o LUVs.
- **Método 5:** formación de vesículas a partir de lípidos disueltos en un medio orgánico soluble en agua, que posteriormente se evapora.
- **Método 6:** mediante la micelización de lípidos formadores de bicapas.
- **Método 7:** a través de lípidos formadores de bicapas que se encuentran inicialmente en un sistema de dos fases agua/aceite.
- **Método 8:** mediante la técnica de microfluídica, que consiste en la formación en serie de vesículas del mismo tamaño mediante un sistema de jeringas en el que se puede controlar tanto el medio interno como el medio externo, e incluso la composición de la monocapa interna y externa.

De entre todos estos métodos, el método de la electroformación, desarrollado por Angelova y Dmitrov (11), es el método más expandido para la preparación de GUVs debido a que es una técnica de formación muy reproducible y las GUVs que se obtienen suelen ser bastante monodispersas y unilamelares (9).

En la presente tesis doctoral la metodología empleada es electroformación. El protocolo seguido para la formación de vesículas unilamelares gigantes se describe a continuación.

En un primer paso se prepara la mezcla con la composición lipídica deseada para la realización del experimento en medio orgánico, por lo general cloroformo o una mezcla de cloroformo:metanol, si el lípido lo requiere. Esta disolución orgánica puede contener una o varias moléculas lipídicas. Si la mezcla está formada, además de los lípidos, por proteínas, se debe emplear una disolución en un medio regulador de pH para evitar la desnaturalización de la proteína. Preparada la mezcla, se deposita una cantidad determinada, que depende de la concentración de lípido (a concentraciones bajas, aproximadamente 1 mg/ mL, se deposita una cantidad de unos 30 μ L; a concentraciones altas, aproximadamente 10 mg/mL, se deposita una cantidad de 10 μ L (12)) sobre las placas de vidrio recubiertas de óxido de indio y estaño (ITO).

Una vez depositada la muestra, estas placas son montadas en forma de célula mediante un espaciador de teflón que deje una distancia de 1 mm entre las mismas y que selle la cámara para su posterior llenado. Esta celda se rellena con la disolución correspondiente al medio interno, formando una célula electroconductiva a modo de condensador.

Elaborada la cámara de formación, se hace pasar una corriente alterna, con una frecuencia, amplitud y tiempo condicionados por la composición de la disolución empleada, en los capítulos de resultados **4, 5 y 6** se especificará el protocolo empleado para el sistema de estudio.

En la Figura 3-8 se muestra una foto y esquema de las placas empleadas para la electroformación de las GUVs de los experimentos de esta tesis.

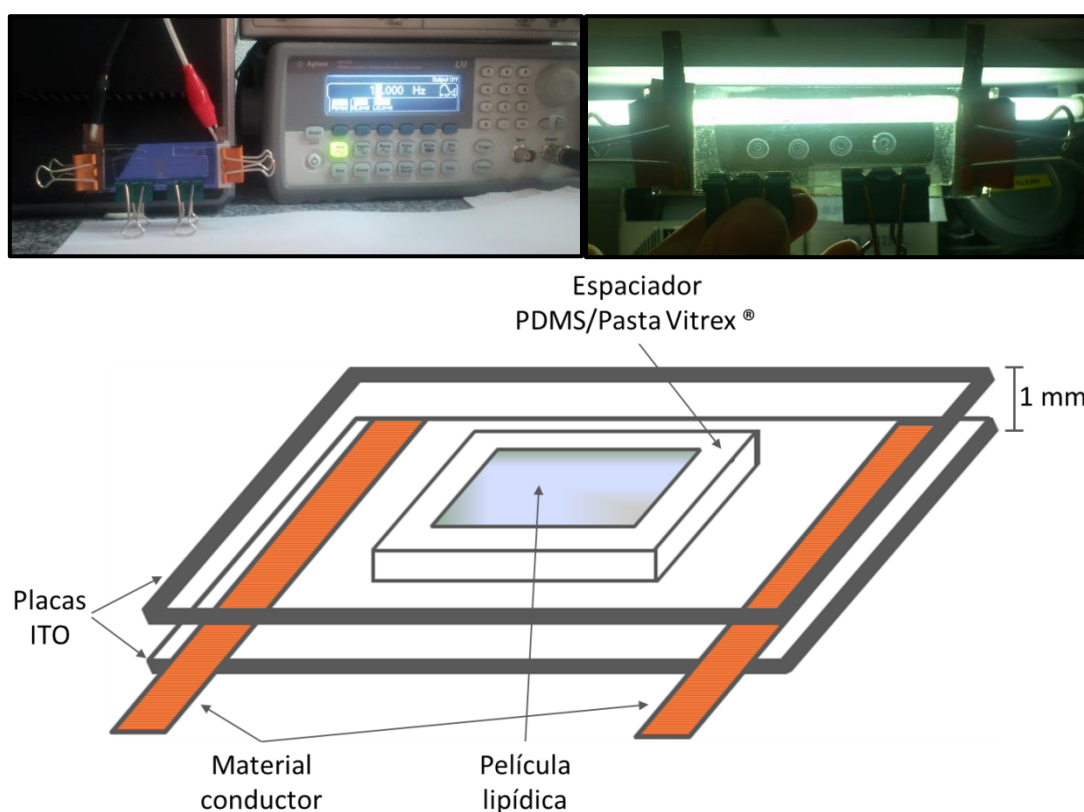


Figura 3-8: *Arriba:* Instalación experimental para la preparación de vesículas unilamelares gigantes mediante la técnica de electroformación. Las placas ITO se ensamblan de tal manera que forman una cámara para la formación de las GUVs, la cual se conecta a un generador de corriente alterna mediante unos hilos conductores, en nuestro caso, de cobre. A la *derecha* se muestra una toma de cerca de uno de los métodos para formar películas lipídicas. *Abajo:* Dibujo esquemático de la celda de electroformación.

3.6. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

Una de las grandes ventajas a la hora de trabajar con liposomas se debe a la posibilidad de poder variar su tamaño en función de nuestras necesidades. Gracias a esta posibilidad de escalado, en este trabajo se ha podido implementar el uso de diferentes técnicas microscópicas.

Estas técnicas nos permiten tanto la observación del aspecto y forma, como la cuantificación de observables, tales como dimensiones, diámetros, longitudes y otras variables morfológicas.

Todos los experimentos realizados con microscopía óptica y fluorescente o confocal que precisaban la presencia de iones divalentes como el calcio se debía de realizar una impermeabilización con caseína o albúmina de suero bovino (BSA), ambas a una concentración del 1%, para evitar el pegado en el cubreobjetos de nuestra muestra. A continuación se detallarán las metodologías empleadas durante los tipos de microscopías utilizadas en la presente tesis doctoral.

3.6.1. Microscopía óptica y fluorescente

Debido al tamaño característico de las muestras (GUVs) empleadas en este trabajo ha podido emplearse la microscopía óptica como técnica de análisis. Las técnicas de visualización fueron llevadas a cabo por contraste de fases, tanto en campo claro como en fluorescencia. Para la observación de las GUVs en campo claro, la disolución interna que se añade a la cámara de electroformación contiene sacarosa, mientras que tras finalizar la electroformación se diluye en un medio que contiene glucosa en una concentración ligeramente superior a la sacarosa del medio interno (13). Este procedimiento nos asegura tres condiciones imprescindibles para los análisis.

1- La diferencia entre los índices de refracción entre los dos azúcares nos permite diferenciar la interfase entre los dos medios, lo cual hace visible la membrana.

2- Debido a la ligera diferencia de concentración entre los dos medios es generado un ligero exceso de área que nos permite poder analizar las fluctuaciones de la membrana.

3- La diferencia de densidad entre los azúcares ($\rho_{sac} > \rho_{glc}$) provoca que las vesículas tiendan a sedimentarse mientras están siendo visualizadas.

Para evitar anomalías por efectos de evaporación y corrientes convectivas del medio, las muestras fueron colocadas entre dos cubreobjetos distanciados entre sí por un separador de teflón con un grosor de 5 mm, sellando así la cámara de observación.

Para la visualización en fluorescencia, en función del tipo de análisis a realizar, los medios empleados fueron los mismos que los utilizados para la visualización en campo claro, pero suplementados con diferentes fluoróforos en función del tipo de ensayo y, para el caso de realizar la visualización en fluorescencia UV, en lugar de emplear cubreobjetos de vidrio, se emplearon de cuarzo.

El microscopio empleado para la realización de los experimentos fue un microscopio NIKON Eclipse TE2000 dotado de una pletina automática con capacidad de movimiento en el plano “z” y manipulación con pipetas. Este microscopio cuenta con una cámara CCD de alta sensibilidad y resolución (1 Mb) NIKON.



Figura 3-9: microscopio NIKON Eclipse TE2000 empleado para los estudios de fluorescencia y vídeo-microscopía de contraste de fases.

3.6.1.1. Técnica de aspiración con micropipetas

El montaje experimental se construyó en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000 equipado con un objetivo 60x y una cámara CCD. Estos experimentos fueron llevados a cabo en una habitación termostatzada a 18 °C para evitar la evaporación de la muestra. Se utilizaron micropipetas de borosilicato cuyas puntas fueron pulidas en una microforja. Para evitar la adhesión del lípido a la micropipeta, las puntas fueron tratadas con albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración del 1%. Las micropipetas fueron montadas en un micromanipulador piezoeléctrico tridimensional para controlar la posición de la punta de la pipeta. Las diferencias de presión fueron impuestas mediante la diferencia de altura de dos vasos comunicantes equipados con un micrómetro.

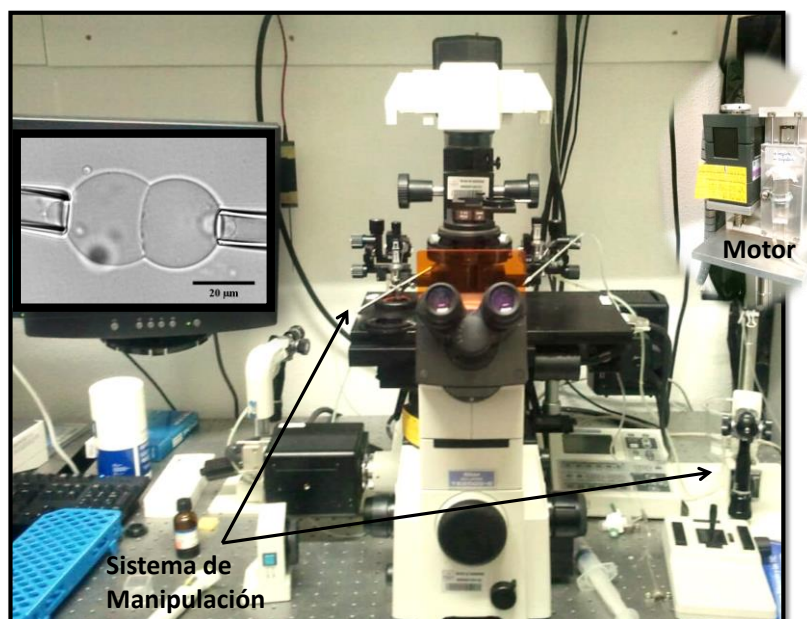


Figura 3-10: Microscopio NIKON Eclipse TE2000 empleado con el sistema de micromanipulación integrado. Con cambios en la altura del depósito de agua del motor se producen los cambios de presión en las pipetas, produciéndose la succión o expulsión de las vesículas.

Los estudios de las interacciones entre célula-célula o célula-matriz tienen un papel fundamental en una gran parte de los procesos biológicos. Debido a ello, los estudios de adhesión celular han despertado gran interés en la comunidad científica. Evans y sus colaboradores realizaron estudios introduciendo la técnica de las micropipetas para realizar estudios de adhesión entre dos células o entre una célula y un sustrato (3; 4; 5; 6; 7). Las aplicaciones que se desarrollaron a partir de dichos experimentos consistían en emplear succión a una célula o vesícula, con micropipetas que se traducía como la fuerza necesaria para romper la adhesión (6; 7; 8). Investigaciones más recientes realizadas por Brochard-Wyart y colaboradores, extendieron esta metodología para obtener la energía de adhesión mediante la medida de la fuerza de ruptura necesaria para separar la célula del área de contacto (9; 10; 11).

La técnica de micropipetas se empleó en los experimentos llevados a cabo en el **capítulo 4 de adhesión mediada por cadherinas** para estudiar el tipo de adhesión y el comportamiento cinético de la misma.

3.6.1.2. Técnica de análisis de contorno

Con el objetivo de obtener el espectro de fluctuaciones de las membranas a partir del análisis de contorno, se toman películas de vesículas que presenten un exceso de área suficiente para que las fluctuaciones térmicas sean visibles al microscopio. Una vez obtenido el vídeo a analizar, se detecta la posición de la membrana con precisión y se reconstruye el perímetro en su totalidad. El principio de detección del contorno está basado en la propiedad de la microscopía en campo claro, donde la diferencia del índice de refracción entre el medio interno y externo de la vesícula hace que su contorno se vea resaltado, más oscuro, y se produce un halo blanco a ambos lados del contorno (23; 24).

Para cada imagen, los puntos del contorno $(\tilde{x}_i, \tilde{y}_i)$ son detectados y almacenados utilizando un algoritmo previamente codificado sobre la base de la propuesta realizada por Perciaux et al. (24). Una vez detectados todos los puntos del perfil, se calcula la longitud de los contornos L , donde \tilde{x}_i e \tilde{y}_i son las coordenadas cartesianas con i variando desde 1 hasta N puntos del contorno detectados para cada imagen instantánea. Por tanto, la distancia curvilínea ds_i se calcula como:

$$3.1 \quad ds_i = \sqrt{(\tilde{x}_{i+1} - \tilde{x}_i)^2 + (\tilde{y}_{i+1} - \tilde{y}_i)^2}$$

Cuando el contorno está cerrado, se cumple:

$$3.2 \quad ds_0 = ds_N = \sqrt{(\tilde{x}_1 - \tilde{x}_N)^2 + (\tilde{y}_1 - \tilde{y}_N)^2}$$

Por lo que la longitud L se obtiene de:

$$3.3 \quad L = \sum_{i=1}^N ds_i$$

Una vez se calcula L , es comparada con su promedio en el tiempo $\langle L \rangle$, de modo que cualquier que perímetro que se desvíe un 10% es desechado. Una vez calculados los contornos, se realiza una transformación de las coordenadas cartesianas $(\tilde{x}_i, \tilde{y}_i)$ a coordenadas polares (r_i, θ_i) donde el centro de la vesícula $(\tilde{x}_C, \tilde{y}_C)$ se define como el promedio de todos los puntos i en el contorno ponderado por la suma de las distancias entre los puntos $i-1$ y i y entre los puntos i y $i+1$:

$$3.4 \quad \tilde{x}_C = \frac{1}{2L} \sum_{i=1}^N \tilde{x}_i (ds_{i-1} + ds_i)$$

Para \tilde{y}_C , se emplea una relación similar. Una vez convertidos a cartesianos polares, el radio, puede definirse como:

$$3.5 \quad r = \frac{1}{4\pi} \sum_{i=1}^N (r_i + r_{i+1}) \times (\theta_{i+1} + \theta_{i-1})$$

Una vez calculados los radios, el siguiente paso consiste en la obtención de los espectros de fluctuaciones $\langle \zeta q \zeta q \rangle$. En una membrana plana, las desviaciones de la posición de equilibrio son pequeñas respecto su tamaño. Las fluctuaciones en un punto de la membrana, se definen como una pequeña variación de la altura de dicho punto, respecto a un plano de referencia, y pueden definirse como

$$3.6 \quad \zeta = \zeta_0 + \delta\zeta$$

Donde $\delta\zeta$ es la variación diferencial de la altura. En la mecánica estadística, este tipo de cálculos se realiza mediante un desarrollo en serie (Armónicos Esféricos, Series de Fourier, etc.) de la variable que caracteriza la desviación respecto a la magnitud de equilibrio. Las características técnicas del microscopio utilizado en nuestros experimentos no permiten visualizar el objeto de estudio en una geometría tridimensional, como consecuencia, las imágenes obtenidas se toman en el plano ecuatorial de la muestra, lo cual nos constriñe a realizar un desarrollo en serie acorde con esta característica. En nuestro análisis, se ha optado por la detección de las fluctuaciones en el plano perpendicular de la membrana, una metodología de

elección por su fácil tratamiento matemático a través del desarrollo del radio r en series de Fourier para así obtener las amplitudes de cada modo de fluctuación:

$$3.7 \quad r(\theta) = R(1 + \sum_{n=1}^{\infty} a_n \cos(n\theta) + b_n \sin(n\theta))$$

donde R es el radio equivalente de la vesícula, el cual es igual al radio de una esfera del mismo volumen, por lo que la condición de volumen constante es necesaria durante el tiempo del experimento. Con este desarrollo en serie, obtenemos del contorno esférico de la vesícula en el plano ecuatorial, donde θ es el ángulo de cambio de radio en coordenadas polares, de modo que al descomponer la forma de la vesícula fluctuante para cada instante de tiempo, en los diferentes modos de deformación, caracterizados por un modo de Fourier n . Los modos n representados en el esquema están relacionado con el radio y el vector de onda q como n/q . A partir de la amplitud de cada modo $c_n = \sqrt{a_n^2 + b_n^2}$ calculamos las fluctuaciones de la posición de la membrana en el tiempo. Considerando que el sistema es ergódico, podemos calcular el espectro de fluctuaciones experimental mediante el promedio temporal de la amplitud de las fluctuaciones c_n para cada modo como

$$3.8 \quad \langle \zeta q \zeta q \rangle = \frac{\pi \langle R \rangle^3}{2} (\langle |c_n|^2 \rangle - \langle |c_n| \rangle^2)$$

En la que $\langle \rangle$ se define como el promedio temporal.

La ecuación anterior es la expresión mediante la cual se calculan la amplitud de las fluctuaciones de la membrana a través de su observación experimental por microscopía óptica, una metodología denominada Espectroscopia de Parpadeo (*Flickering Spectroscopy*). (25)

3.6.2. Microscopía confocal

La *microscopía confocal*, es una de las herramientas de microscopía óptica más empleada en el ámbito de la investigación biológica. Esto se debe a que presenta mejor resolución (la luz procedente de otros planos está limitada), tanto para estudios de reconstrucción tridimensional por tomografías en el plano Z , como para estudios de co-localización con dos sondas fluorescentes diferentes.

Su funcionamiento, se caracteriza por la utilización de una o varias fuentes de excitación (Láser). La luz láser pasa a través de un filtro y un diafragma que expande el rayo de luz, los haces de luz obtenidos de la expansión se reflejan en un espejo dicróico provocando la focalización de estos haces en el mismo plano de la muestra. La radiación fluorescente emitida atraviesa este mismo espejo dicróico y llegando al segundo diafragma situado justo frente al detector, el cual sólo permite llegar al detector la luz perteneciente a ese plano focal. Existe un tipo particular de microscopio confocal (microscopía confocal de barrido) que posee un sistema de espejos que mueve la luz procedente de la fuente de excitación en el plano X - Y de la muestra, haciendo posible el escaneado o barrido de la fluorescencia de una región determinada de la muestra en el mismo plano focal. La emisión de luz de cada una de estas secciones barridas ópticamente es recogida en un fotomultiplicador y enviada al ordenador para su procesamiento. Si el barrido se repite en planos sucesivos a lo largo del eje Z , se puede reconstruir

una imagen tridimensional de la muestra. Cabe destacar que esta técnica permite detectar simultáneamente distintos fluoróforos (en el caso de la co-localización de distintas sondas fluorescentes) cuando se usan simultáneamente distintas longitudes de onda de excitación al tener múltiples fuentes láser (12).

Se utilizó un microscopio confocal Nikon Eclipse Ti, equipado con un detector 3PMTs de dos etapas, con dos láseres de longitudes de onda 488 nm y 561 nm para la emisión en el canal verde (proteína) y en el rojo (rodamina). Las imágenes se tomaron usando el software NIS-Elements C. Este equipo de microscopía confocal pertenece al grupo de investigación del Dr. Iván López Montero de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense.



Figura 3-11: Fotografía del microscopio confocal perteneciente al grupo de investigación del Dr. Iván López Montero de la facultad de Ciencias Químicas de la UCM.

3.6.3. Crio-microscopía de transmisión electrónica (Crio-TEM)

Mediante esta técnica se puede visualizar y obtener información acerca de la estructura, morfología y tamaño. Su fundamento reside en hacer incidir un haz de electrones sobre una muestra previamente vitrificada. Cuando los electrones atraviesan la muestra sufren interacciones elásticas e inelásticas muy fuertes. Las inelásticas son principalmente consecuencia de la interacción entre los electrones y la corteza del átomo, provocando pérdidas de energía, ruido en imágenes y daños estructurales en los especímenes. Las interacciones elásticas se producen por la interacción entre los electrones y el campo electrostático de los núcleos atómicos, siendo responsables, por otra parte, del contraste de la imagen. Para evitar los daños causados por irradiación y vacío, como para aumentar el contraste de la imagen, la preparación de esta muestra se realiza mediante congelaciones ultrarrápidas, de esta forma, el agua permanece en una conformación vítrea (se evita la aparición de cristales) (13).

Para la microscopía electrónica se utilizaron rejillas Quantifoil de Cu/Rh de 300 huecos R 2/2 cubiertas de una fina película de carbón y rejillas Multi-A, sobre las que se aplicaron 3 µl de muestra a una concentración de 2 mg/ml. Tras una incubación de 5 minutos, en presencia de partículas de oro para la posterior caracterización estructural, las rejillas fueron bloteadas 2 segundos y congeladas rápidamente en etano líquido utilizando una unidad de vitrificación

Leica EM CPC. Las rejillas vitrificadas fueron transferidas a un microscopio electrónico FEI Tecnai G2 F20 operado a 200kV en condiciones criogénicas utilizando un crio-brazo Gatan. Las imágenes se registraron bajo condiciones de mínima dosis.

La crio-microscopía electrónica se hizo con la colaboración de la Dra. Rocío Arranz en el CAI del Centro Nacional de Biotecnología.



Figura 3-12: Fotografía del microscopio electrónico del centro nacional de biotecnología, dirigido por el Dr. José María Valpuesta.

REFERENCIAS:

1. *Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes.* **Kant, Theodore L. Steck and Jeffrey A.** 1974, *Methods in Enzymology*, págs. 172-180.
2. *Artificial spectrin shells Reconstituted on Giant Ve.* **Iván López-Montero, Ruddy Rodríguez-García, and Francisco Monroy.** 2012, *Physical chemistry letters*, Vol. 3, pág. 1583–1588.
3. *Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin.* **Brieher, WM., Yap, AS y Gumbiner, BM.** 2, 1996, *Journal of Cel Biology*, Vol. 135.
4. *C-Cadherin Ectodomain Structure and Implications for Cell Adhesion Mechanisms.* **Titus J. Boggon, John Murray, Sophie Chappius-Flament, Ellen Wong, Barry M. Gumbiner, Lawrence Shampiro.** 5571, 2002, *Science*, Vol. 296, págs. 1308-1313.
5. *Domain-Growth Kinetic Origin of Nonhorizontal Phase Coexistence Plateaux in Langmuir Monolayers: Compression Rigidity of a Raft-Like Lipid Distribution.* **L. R. Arriaga, I. López-Montero, J. Iñes-Mullol and F. Monroy.** 2010, *J. Phys. Chem. B.*, Vol. 114, pág. 4509.
6. **Jones, Malcolm N. y Chapman, Dennis.** *Micelles, monolayers and biomembranes.* New York : Wiley-Liss, Inc., 1995.
7. **Weissig, Volkmar, [ed.].** *Liposomes: Methods and Protocols.* Glendale, AZ, USA : Humana Press, 2010. Vol. 2: biological membrane models.
8. **Walde, Pier Luigi Luisi and Peter, [ed.].** *Giant Vesicles: Perspectives in Supramolecular Chemistry.* Zürich : s.n., 2000. Vol. 6.
9. *Giant Vesicles: Preparations and Applications.* **Walde, P. y al, et.** 7, 2010, *ChemBioChem*, Vol. 11, págs. 848-865.
10. *Liposome preparation and size characterization.* **Woodle, M.C. y Papahadjopoulos, D.** 1989, *Methods Enzymol*, Vol. 171, págs. 193-207.
11. *Liposome electroformation.* **Dimitrov, M. I. Angelova and D. S.** 1986., *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, Vol. 81, pág. 303.
12. *Giant Unilamellar Vesicles Electroformed from Native Membranes and Organic Lipid Mixtures under Physiological Conditions.* **Montes, L. R., Alonso, A. y Bagatolli, L. A.** 2007, *Biophysical Journal*, Vol. 93, págs. 3548-3554.
13. **Karp, Gerald.** *Cell and molecular biology. Concepts and experiments.* United States of America : John Wiley & Sons, Inc, 2010.
14. *Analysis of adhesion of large vesicles to surfaces.* **Evans, E.** 1980, *Biophysical J.*, Vol. 31, pág. 425.

15. *Attraction between lipid bilayer membranes in concentrated solutions of nonadsorbing polymers: comparison of mean-field theory with measurements of adhesion energy.* **E. Evans, D. Needham.** 6, 1988, *Macromolecules*, Vol. 21, págs. 1822-1831.
16. *Adhesion of surfactant—membrane covered droplets: Special features and curvature elasticity effects.* **Evans, Evan.** 2, 1990, *Colloids and Surfaces*, Vol. 43, págs. 327-347.
17. *Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. II. Mechanical energies to separate large contact areas.* **Evans, E, y otros, y otros.** 4, 1991, *Biophysical Journal*, Vol. 59, págs. 849-860.
18. *Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces.* **Evans, E., Ritchie, K., and Merkel, R.** 1995, *Biophysical Journal*, Vol. 68, págs. 2580–2587.
19. *Force versus axial deflection of pipette-aspirated closed membranes.* **V. Heinrich, C. Ounkomol.** 2007, *Biophysical Journal*, Vol. 93, págs. 363-372.
20. *Unbinding of adhesive vesicles.* **F. Brochard, P.-G. de Gennes.** 2003, *C.R. Physique*, Vol. 4, págs. 281-287.
21. *Enforced Detachment of Red Blood Cells Adhering to Surfaces: Statics and Dynamics.* **S . Pierrat, F. Brochard-Wyart, P. Nassoy.** 4, 2004, *Biophysical Journal*, Vol. 87, págs. 2855-2869.
22. *Adhesion and membrane tension of single vesicles and living cells using a micropipette-based technique.* **Colbert, M.J., y otros, y otros.** 2009, *European Physical Journal E*, Vol. 30, págs. 117-121.
23. *Mapping vesicle shapes into the phase diagram: A comparison of experiment and theory.* **Döbereiner, H.G., et al.,.** 4, 1997, *Physical Review E*, Vol. 55, págs. 4458-4474.
24. *Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles.* **Pécréaux, J., et al.,.** 3, 2004, *European Physical Journal E*, Vol. 13, págs. 277-290.
25. *Subdiffusive fluctuation dynamics of rigid membranes as resolved by ultrafast videomicroscopy.* **R. Rodríguez-García, M.Mell, I. López-Montero, F. Monroy.** 2, 2011, *Europhysics Letters*, Vol. 94, pág. 28009 .
26. *Adaptive aberration correction in a confocal microscope.* **al, M.J. Booth et.** 9, 2002, *PNAS*, Vol. 99, págs. 5788-5792.

Parte II

RESULTADOS

CAPÍTULO 4:

MECÁNICA DE ADHESIÓN

CELULAR MEDIADA POR

C-CADHERINA

En este capítulo se ha realizado el estudio del mecanismo de adhesión de dos o más vesículas, abordando dos tipos de adhesiones, inespecífica, o debida a interacciones electrostáticas, y específica, mediada por las proteínas de adhesión C-cadherinas en presencia de iones calcio; así como estudios de energética adhesiva.

Este capítulo está basado en el artículo:

Silvia Isanta, Rubén Hervás, Javier Oroz, Rocío Arranz, Laura R. Arriaga, Iván López-Montero, Lara H. Moleiro, Jose María Valpuesta, Mariano Carrión-Vázquez and Francisco Monroy “*Mulberry-polysomes: reversible adhesion by C-cadherins of structural morula based on lipid vesicles*” (en preparación)

4.1. INTRODUCCIÓN

La **adhesión** celular es la propiedad biológica clave para el mantenimiento de las estructuras multicelulares que conforman los tejidos. De hecho, la regulación de la adhesión es necesaria para determinados procesos morfogénéticos como son la migración celular y la segregación tisular. (1)

Una de las familias de proteínas encargadas de la adhesión celular es la familia de las cadherinas. En las adhesiones celulares, el principal papel que tienen estas proteínas es el aportar una energía de adhesión necesaria para poder obtener una unión óptima con las células circundantes. La inexistencia o depleción de dicha componente esencial del proteoma da lugar a la repulsión celular como resultado de la interacción electrostática de dobles capas entre membranas próximas. Las dos funciones principales de la energía de adhesión son el controlar la fuerza adhesiva y la morfología del contacto celular (2).

En “biología sintética” mediante aproximaciones reconstitutivas e ingeniería genética, se pretenden estudiar algunos de los procesos celulares a través de la reconstitución de ciertas funciones celulares en realizaciones artificiales. Pero crear un modelo celular funcional para poder estudiar el fenómeno de adhesión en detalle es bastante complicado debido a la cantidad de procesos implicados en la célula. Una alternativa es el diseño de sistemas artificiales bio-inspirados formados por bicapas de fosfolípidos que sirven como modelo mínimo de la membrana celular en forma plana o como bicapas esféricas, como son las vesículas unilamelares gigantes (GUVs). Estas GUVs tienen un tamaño mayor a 10 μm , tamaño comparable a las células, y se pueden estudiar mediante microscopía óptica.

En este capítulo se realiza la reconstitución parcial de una cadherina prototípica en sistemas modelo tridimensionales para poder estudiar las energías implicadas en los procesos de adhesión intercelulares así como poder realizar el estudio estructural y cinético de las mismas.

4.2. ABORDAJE EXPERIMENTAL

En este estudio se emplean GUVs formadas con dioleoylfosfatidilcolina (DOPC), que es un fosfolípido muy abundante en las membranas celulares. La proteína que empleamos no está completa, sólo tenemos el dominio extracelular, es decir el tándem de los 5 ectodominios (EC), el cual tiene un *tag* de seis histidinas (*His-Tag*) en el carbono terminal (Ct). Para que exista una unión de la proteína con la membrana artificial, se prepara una mezcla lipídica que contiene un porcentaje variable (desde 0 al 30%) de lípido DOGS-NTA (ácido iminoacético). El DOGS-NTA o Ni-NTA es un lípido quelante que forma un complejo de coordinación con la cola (*tag*) de histidinas de la proteína modificada genéticamente en presencia de cationes metálicos bivalente como es el Ni^{2+} , y de este modo se puede realizar el anclaje a la membrana lipídica al no poseer la hélice transmembrana (figura 4-1).

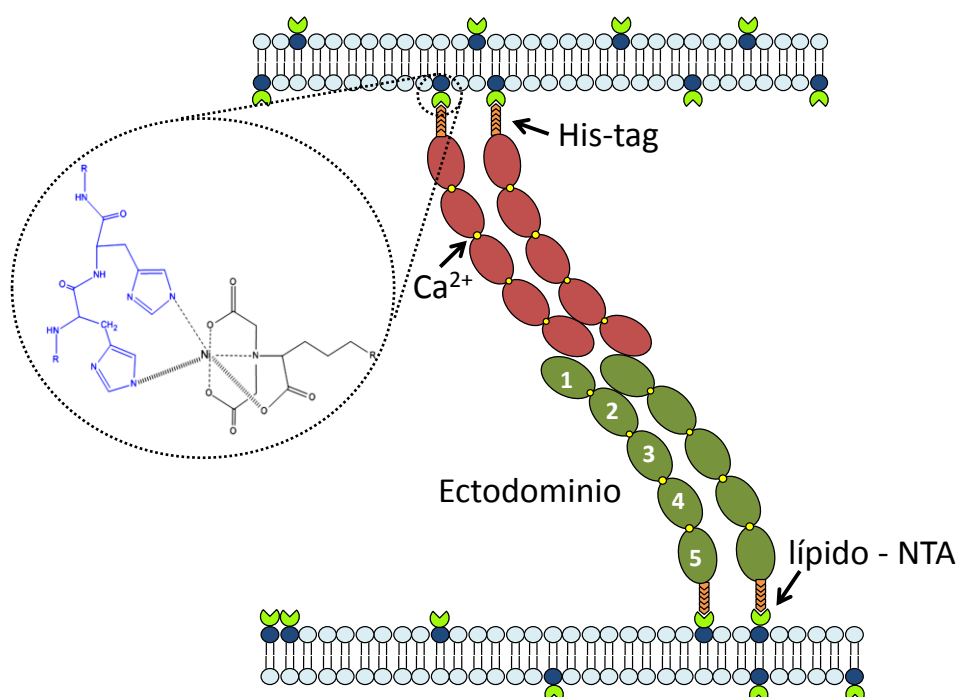


Figura 4-1: Dibujo esquemático del abordaje experimental del sistema formado por Ni-NTA y DOPC, como formadores de membrana, y el ectodominio de la cadherina unido al lípido de anclaje mediante el tag de 6 histidinas.

Para la realización de este trabajo se ha preparado el sistema artificial en dos sistemas modelo distintos: en vesículas unilamelares grandes (*LUVs*) para la realización de los experimentos en *cryo-TEM*, y en vesículas unilamelares gigantes (*GUVs*) para la realización de los demás experimentos, realizados con microscopía óptica confocal y contraste de fases/fluorescencia.

4.2.1. Formación del sistema artificial

- FORMACIÓN DE *LUVs*: EXTRUSIÓN

Para la preparación de vesículas unilamelares grandes para los experimentos de *cryo-TEM* se preparó una película de lípidos concentrados (10 mM) en la composición deseada para optimizar la adición de proteína y mediante hidratación y agitación con la fase acuosa (medio tamponado para la proteína). En este proceso se obtienen vesículas multilamelares (*MLVs*) de modo que, para obtener las *LUVs* se procesan las *MLVs* haciéndolas pasar a través de un filtro de policarbonato de tamaño de poro definido (100 nm) un número impar de veces, provocando la ruptura de las *MLVs*. Mediante esta técnica se consiguen vesículas unilamelares de tamaño promedio al tamaño del poro.

- FORMACIÓN DE **GUVs**: ELECTROFORMACIÓN

La formación de las *GUVs* se realizó mediante la técnica de *electroformación*. La electroformación consiste en depositar una fina capa de lípidos, de concentración conocida (~1 mM disuelta en cloroformo) en las placas *ITO* (Indium-Tin-Oxide) que son conductoras. Los lípidos formadores de membrana para este experimento son DOPC y el lípido de anclaje de la proteína Ni-NTA, con un 1 % de Rh-PE, que es una sonda fluorescente de lípidos observable en el rojo, en forma de gotas.

Una vez está evaporado el disolvente orgánico, se sella la celda con una capa de 1 mm de espesor de pasta Vitrex®, y se llena con sacarosa, cuya osmolaridad debe ser igual a la del medio exterior – disolución tamponada – y se conecta a un campo eléctrico a 8 Hz y 1.1 V durante dos horas, bajando a 4 Hz y 1.1 V durante 30 minutos para favorecer el despegado de las *GUVs* de las paredes. Durante este proceso se habrán formado las *GUVs* cuyo interior contendrá sacarosa. El uso de la sacarosa es fundamental para poder realizar la posterior observación en el microscopio óptico en contraste de fases.

Formadas las vesículas, se realiza la incubación con la proteína, donde se formará el complejo Ni-NTA – 2His, mediante un enlace covalente coordinado, quedando unido a la membrana lipídica. Transcurrido el tiempo de incubación, de aproximadamente 1 h, de la proteína se realiza la incubación con el anticuerpo *anti-his*, este anticuerpo es fluorescente y emite en el canal del verde.

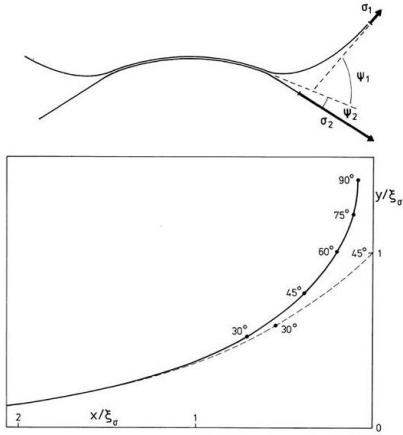
Realizadas todas las incubaciones, se observará en el microscopio óptico en campo claro mediante contraste de fases (sacarosa con glucosa-tampón) y en fluorescencia tanto en el canal del rojo, para el estudio de los lípidos, como en el canal del verde, para el estudio de la unión de proteína a la membrana.

4.2.2. Análisis de resultados: energética

Uno de los objetivos de este trabajo es realizar el estudio de las energías de adhesión que intervienen en las uniones célula-célula, o extrapolado a esta tesis, liposoma-liposoma. Para el análisis de las energías de adhesión, nos hemos basado en los estudios realizados por Helfrich y Servuss (3) de adhesión a través de los ángulos de contacto de dos vesículas, teniendo en cuenta las tensiones laterales de las membranas y los módulos de *bending*, o rigidez de flexión, de las mismas.

Valorados estos factores, la energía de adhesión se podría calcular como un balance de energía [4-1]: por un lado la *energía de curvatura*, en la que se tiene en cuenta el módulo de *bending* (κ), los ángulos locales de contacto (ϕ) y la longitud del contorno (s). Por otro lado se tiene en cuenta la *energía superficial*, donde σ es la tensión superficial (4). De este modo, la energía total de la membrana adhesiva se puede escribir como:

$$4-1 \quad F_{adh} = \frac{1}{2} \kappa_c \left(\frac{d\phi}{ds} \right)^2 + \sigma(1 - \cos \phi) ; F_{adh} = F_{curv} + F_{sup}$$



Que tras ser minimizada, da lugar a la ecuación de *Euler-Lagrange*, donde la variación del ángulo de contacto frente a la longitud de contorno queda en función del módulo de *bending* [4-2],

$$4-2 \quad \frac{d^2\phi}{ds^2} = \frac{\sigma}{\kappa_c} \sin \phi$$

la cuál puede ser aproximada a ángulos bajos de ϕ :

$$4-3 \quad \frac{d^2\phi}{ds^2} \approx \frac{\sigma}{\kappa_c} \phi$$

Figura 4-2: imagen tomada de (3), donde se muestra el contacto adhesivo entre dos vesículas, junto con las tensiones de membrana y los ángulos de contacto.

De acuerdo con la definición de la longitud angular de correlación, que es la orientación bajo la tensión de membrana,

$$4-4 \quad y = \xi \exp\left(\frac{x - x_0}{\xi}\right) + y_0$$

se puede obtener una solución aproximada (ecuación 4-5) a modo de exponencial, en función de la longitud de correlación parametrizada, en función del contorno de la membrana en coordenadas cartesianas.

$$4-5 \quad \xi^i = \left(\frac{\kappa_c}{\sigma_i} \right)^{1/2}$$

Para poder aplicar la base teórica a los datos obtenidos se realiza un procesamiento de imágenes. A partir de las imágenes obtenidas con el microscopio de contraste de fases, se extrae su contorno con la ayuda de un programa de análisis de imágenes (*Image J*) y se transforma en coordenadas cartesianas a través de un programa en MATLAB^{§§}. Es importante que las dos vesículas adheridas sean lo más simétricas posibles para obtener un mejor resultado y separarlo en dos cuadrantes, $i=1$ e $i=2$.

Del contorno del contacto adhesivo entre dos vesículas, se realiza el ajuste exponencial con ecuación de *Servuss-Helfrich* (3), desde el punto en el que comienza la adhesión para cada cuadrante como se observa en la gráfica. De dicho ajuste se obtiene la longitud de correlación de la pendiente (ξ). Siendo la definición de la longitud de correlación es la raíz cuadrada de la variación de módulo de bending (κ) frente a la tensión de membrana (σ) (ecuación 4-5) (5).

^{§§} Programa realizado por el Dr. Ruddy Rodríguez.

Para obtener el módulo de *bending*^{***} se realizan experimentos de análisis del espectro de fluctuaciones, o *flickering*, donde también se obtiene la tensión lateral de la membrana.

Para obtener la fuerza de adhesión mediante ángulos de contacto se emplea la ecuación de Young, la cual relaciona las tensiones calculadas con la ecuación aproximada de Servuss-Helfrich, con los ángulos de contacto obtenidos con la ayuda del programa de procesamiento de imágenes *Image J*.

$$F_{adh} = \sigma_1(1 - \cos \Psi_1) + \sigma_2(1 - \cos \Psi_2)$$

$$\Psi_1 \neq \Psi_2$$

4-6

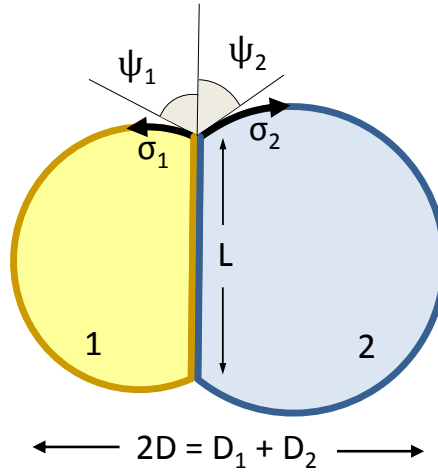


Figura 4-3: Dibujo esquemático de la adhesión de dos vesículas con los parámetros definidos: L, longitud del contacto adhesivo; σ , tensión de membrana; D, diámetro de la vesícula; Ψ , ángulo de contacto.

Para poder calcular las energías adhesivas se emplea la ecuación 4-7, siendo esta energía, la fuerza de adhesión por el área del contacto adhesivo (ecuación 4-8), representado en la Figura 4-3.

4-7

$$G_{adh} = F_{adh} \cdot A$$

4-8

$$A = \pi \cdot R^2 = \pi \left(\frac{L^2}{4} \right)$$

*** Módulo de bending obtenido para nuestra composición: $\kappa_c = 3,40 \cdot 10^{-20} \text{ J}$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Contactos adhesivos

Para realizar el estudio del contacto adhesivo entre dos o más vesículas, se formaron vesículas compuestas por lípido DOPC y Ni-NTA, en presencia de proteína, que se expresará en función del porcentaje de Ni-NTA presente en la mezcla lipídica ya que éste es el factor limitante de cadherina al formar un complejo unido con un enlace covalente coordinado.

4.3.1.1. Adhesión para $N = 2$

Se han realizado experimentos control de adhesión para poder tener la certeza de que dos vesículas que se adhieren están unidas mediante cadherinas, es decir, una unión específica, y no una unión mediada por los cationes del medio como se ha observado en otros trabajos como (3; 6; 5). Para ello se prepararon muestras para condiciones de adhesión específica – presencia de cadherina – con distintos cationes presentes como son el Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ y observar la dependencia de las cadherinas con el calcio; y muestras para condiciones inespecíficas – ausencia de cadherina – y en presencia de los cationes divalentes y monovalentes antes nombrados. También se prepararon muestras en presencia de complejos quelantes de calcio (AEDT).

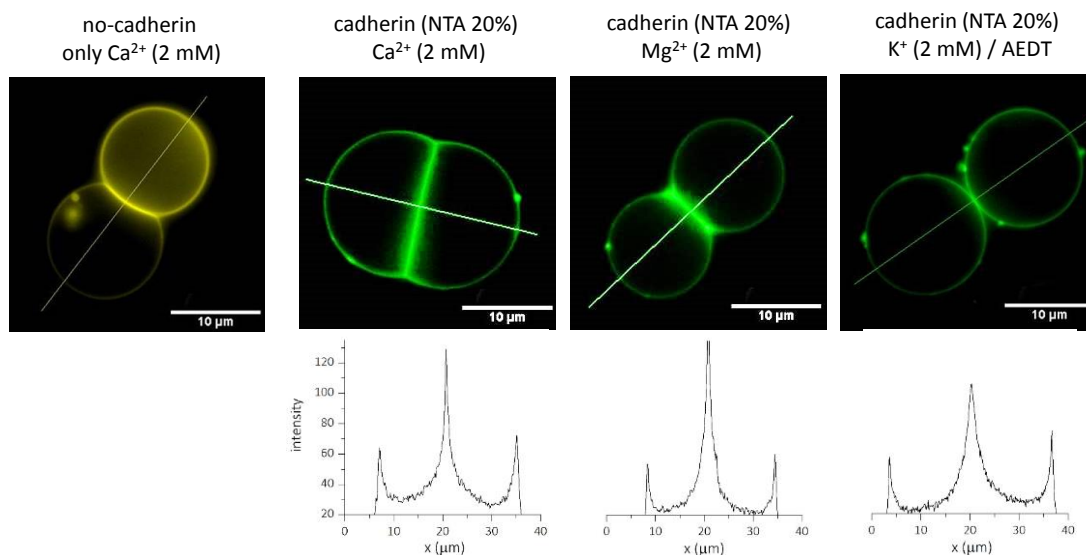


Figura 4-4: Imágenes de experimentos de adhesión y experimentos control, según sea específica (presencia de cadherina) o inespecífica (ausencia de cadherina), en presencia de los distintos iones. Se observa una clara diferencia entre los cuatro experimentos: (a) en amarillo el canal lipídico, donde se observa una adhesión inespecífica mediada por calcio con bordes adhesivos redondos; (b) (c) y (d) en verde el canal de fluorescencia de proteína, donde se observa en (b) una adhesión fuerte con los bordes clásicos rectos presentes en la adhesión celular, en (c) una adhesión muy débil mediada por Mg^{2+} , y en (d) la ausencia de adhesión cuando está presente en el medio el compuesto quelante de calcio (AEDT) o en presencia de K^+ . Abajo los correspondientes perfiles de intensidad de fluorescencia donde se observa que el pico central, correspondiente a la unión adhesiva, es más del doble que los picos correspondientes a la membrana lipídica señalando la presencia de cadherinas en la unión.

Como se muestra en la Figura 4-4, se observa que en ausencia de cadherina la adhesión presente forma contactos adhesivos típicos de adhesiones inespecíficas, es decir, zonas curvas. En cambio, en presencia de cadherina, las zonas de contacto son rectas debido a la interacción de las proteínas entre sí de dos vesículas vecinas. Cabe destacar que los experimentos de adhesión específica con iones distintos al calcio presenta una adhesión débil. En el caso de la unión en presencia de magnesio es similar a la unión inespecífica de la figura izquierda, y en presencia de potasio o de EDTA, no se llega a producir unión.

Una de las características de las uniones fuertes entre dos vesículas o células, es la presencia de ángulos de contacto cercanos a 90° , provocando uniones muy rectas. Esta característica de adhesión se observa claramente en la Figura 4-4, como se comentó en el párrafo anterior. Estos ángulos de los contactos adhesivos se han medido en distintas muestras, en presencia y ausencia de cadherinas, y se ha observado que las adhesiones mediadas por calcio los ángulos son bajos, en torno a 30° , mientras que en adhesiones mediadas por cadherina, en presencia de calcio, los ángulos de adhesión son en torno a los 85° como se muestra en la Figura 4-5.

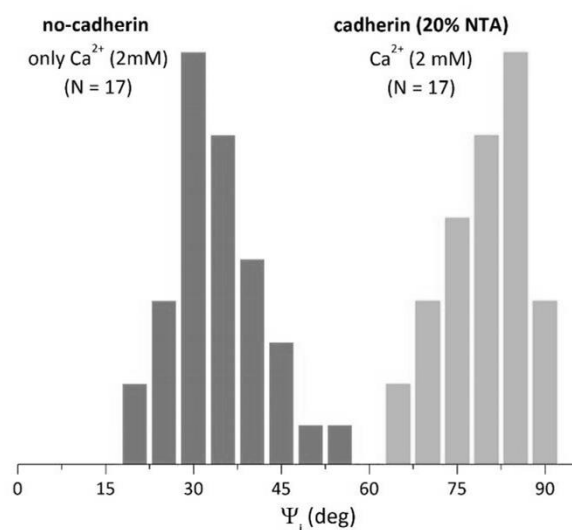


Figura 4-5: Gráfica de ángulos de contacto en ausencia de cadherina, es decir, adhesiones inespecíficas mediadas por iones calcio, y presencia de cadherina e iones calcio en la muestra, adhesiones específicas.

En los experimentos de adhesión específica se ha seguido el mismo protocolo de incubación, las *GUVs* obtenidas mediante electroformación se incuban con cadherina durante una hora, previamente se realiza la incubación del anticuerpo fluorescente con la proteína, poder localizar la proteína en la membrana. Se realizó una variación en el protocolo para ver si el anticuerpo afectaba a la actividad adhesiva de la proteína realizando la incubación en primer lugar de la proteína con las *GUVs*, y una vez estuviera la incubación, añadir el anticuerpo fluorescente.

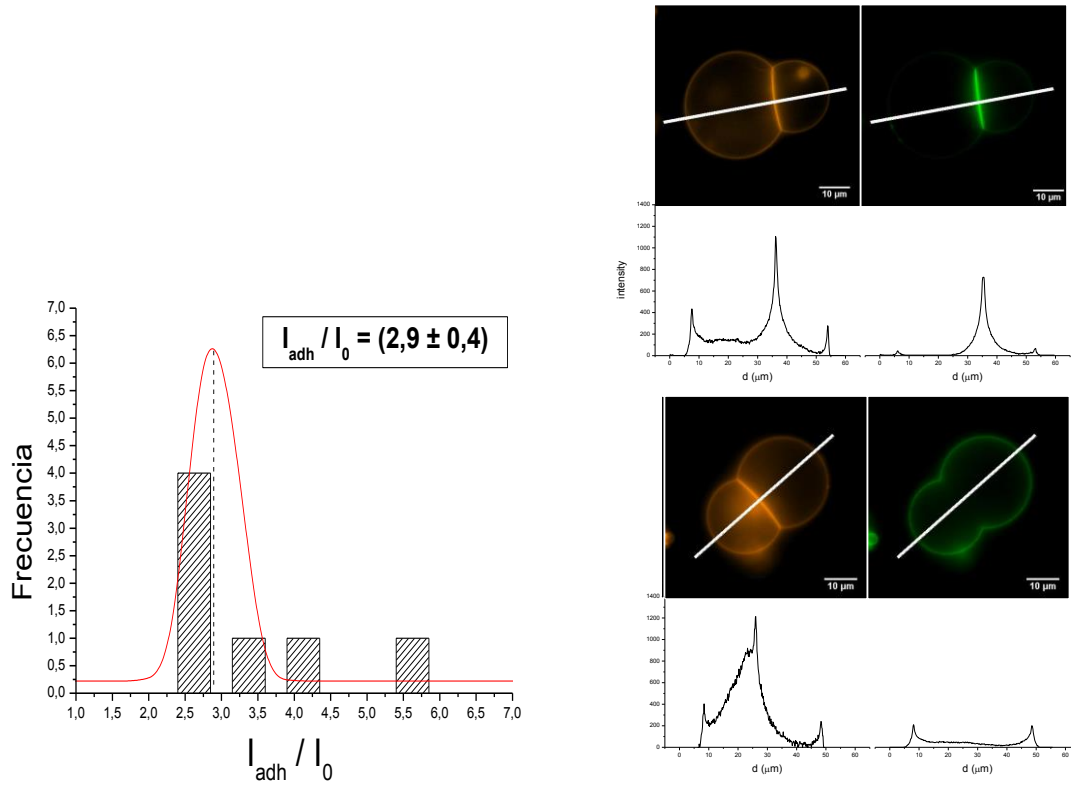


Figura 4-6: *Izquierda*, gráfica donde se muestra el estudio de la variación de la intensidad del contacto adhesivo como relación de I_{adh}/I_0 en el canal de fluorescencia de la proteína. *Derecha*, dos escenarios distintos de adhesión de dos vesículas distintas en función del tipo de incubación con el anticuerpo fluorescente. *Arriba*, incubación de la proteína con el anticuerpo en un primer paso y posterior incubación con las vesículas, observándose la fluorescencia con gran intensidad en la zona del contacto adhesivo. *Abajo*, incubación de las vesículas con la proteína en un primer paso y posterior incubación con el anticuerpo fluorescente, observándose que en la zona del contacto adhesivo no ha podido penetrar el anticuerpo, mostrando fluorescencia en el resto de membrana debido a la proteína que haya quedado sin interactuar. Siendo las fotografías en color naranja el canal de observación de lípido y verde el de proteína.

Se observa que los anticuerpos no afectan a la adhesión como cabía esperar, pero sí se observa una diferencia entre las dos incubaciones. Al realizar los experimentos de adhesión con proteína marcada fluorescentemente, prácticamente toda la fluorescencia se presenta en la zona del contacto adhesivo, mientras que, si la adición de el anticuerpo fluorescente se realiza una vez las vesículas ya se han pegado, el anticuerpo no es capaz de penetrar en la unión adhesiva.

En el estudio de los perfiles de intensidad de adhesión para el canal de proteína, es decir, el canal del verde (Figura 4-6), se obtiene como promedio una relación I_{adh}/I_0 cercana a 3. Si solo se tratase de una unión inespecífica, la intensidad debería ser el doble o menor, correspondiendo a la intensidad de fluorescencia de la membrana lipídica. Esto señala la localización de la cadherina en la zona de contacto.

En este caso al incubar con los anticuerpos fluorescentes, los tiempos de espera para poder observar la muestra son mayores, y el número de vesículas es menor.

4.3.1.2. Contacto adhesivo $N \geq 2$.

Como se ha visto hasta ahora, las vesículas gigantes tienen tendencia a formar uniones dos a dos. Esto es lo que se observa a concentraciones bajas de cadherina, es decir, del orden de $0.04 \mu\text{M}$. Sin embargo, cuando la concentración de proteína es mayor, $4 \mu\text{M}$, se observan agregaciones de dos o más de dos vesículas.

Se realizó un estudio de los ángulos de adhesión entre tres vesículas de diversos tipos estructurales para obtener el ángulo al cuál la estabilidad de los agregados es mayor. Los resultados obtenidos, sobre una muestra de 86 agregados fueron los que se adjuntan en la gráfica.

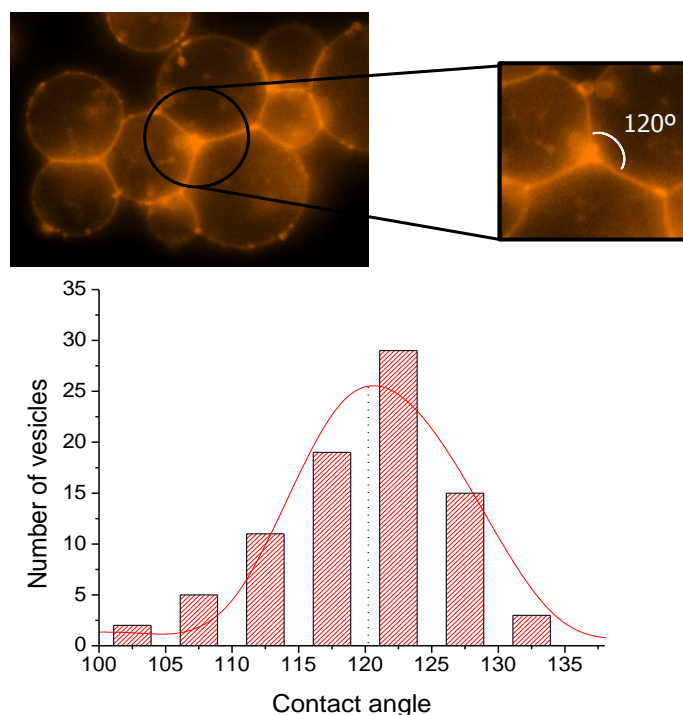


Figura 4-7: Arriba, fotografía de una agregación de vesículas donde se observa la tendencia a formar ángulos de 120° en el contacto adhesivo. Abajo, gráfica donde se muestra la estadística para 86 muestras distintas, de la tendencia de los ángulos de contacto para $N > 2$ vesículas.

Los resultados obtenidos arriba muestran la tendencia del ángulo de contacto en un triplete de vesículas, ya sea en forma de agregado o de vesículas independientes. Como se observa, los ángulos oscilan entre los 100° y 135° , esto se debe a que hay casos en los que para $N > 2$, las vesículas se agrupan formando hileras para mantener la estabilidad (figura 4-9).

Al igual que en los dobletes de adhesión, donde se ha estudiado la variación de la intensidad de adhesión en la zona del contacto adhesivo, para adhesiones donde el número de vesículas, N , es mayor que 2 se ha querido estudiar si la adhesión mediada por cadherinas a una concentración diez veces mayor, tiene el mismo comportamiento.

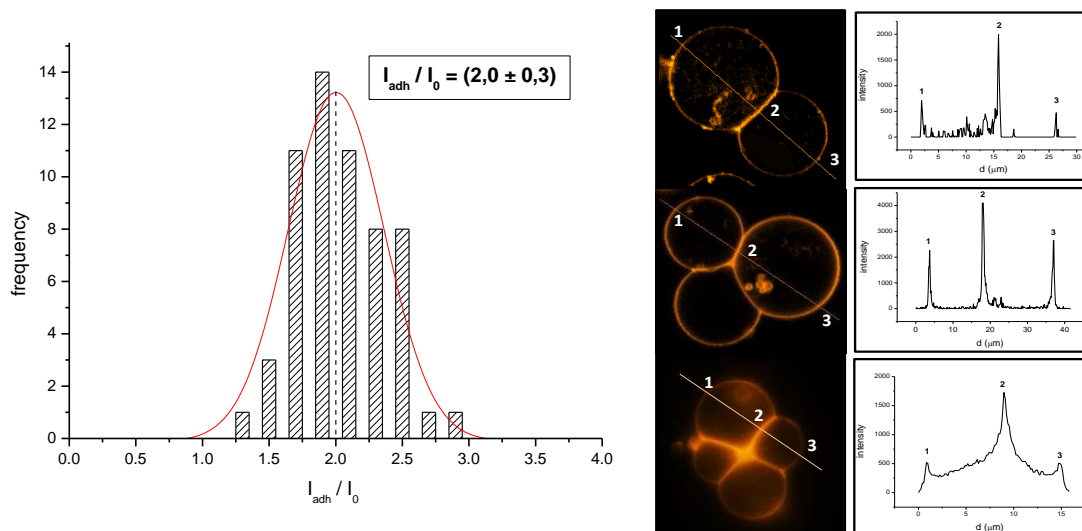


Figura 4-8: *Izquierda*, gráfica donde se muestra el estudio de la variación de la intensidad del contacto adhesivo como relación de I_{adh}/I_0 , siendo I_{adh} la intensidad en el contacto adhesivo, e I_0 la intensidad de un punto de la membrana, representados los perfiles representativos de tres muestras distintas a la *derecha*.

En la figura 4-8 se representa el estudio de la variación de I_{adh}/I_0 , siendo I_{adh} la intensidad en el punto representado como 2, que es la del contacto adhesivo, e I_0 la intensidad representada como 1 o 3 en la figura, que es la intensidad de la membrana lipídica para 70 muestras. La relación de intensidad contacto adhesivo es el doble que la intensidad de la membrana lipídica, que es ligeramente inferior a la obtenida en Figura 4-6, puede deberse a que en este caso, al formar multipletes, es decir, agrupaciones de más de dos vesículas, la proteína está deslocalizada a lo largo de la zona de contacto adhesivo.

En la Figura 4-9 se muestra una serie de imágenes tomadas en preparaciones diferentes donde se muestran las distintas geometrías que toman las vesículas para $N > 2$ para concentraciones de cadherina elevadas. En todas ellas se muestra una elevada intensidad fluorescente en la zona del contacto adhesivo señalando la presencia de cadherinas. Es posible que para los triplete presentes, con el tiempo, lleguen a formar estructuras con ángulos de contacto cercanos a los 120° . En la misma figura, arriba, se muestra una secuencia, para un mismo multiplete, en los distintos canales de fluorescencia, siendo en naranja el canal de fluorescencia lipídico y el verde el de proteína, tomada con un microscopio confocal. En ella se observa que la unión adhesiva tiene mayor intensidad, y al mezclar los dos canales (*merge*), está más acentuada la fluorescencia.

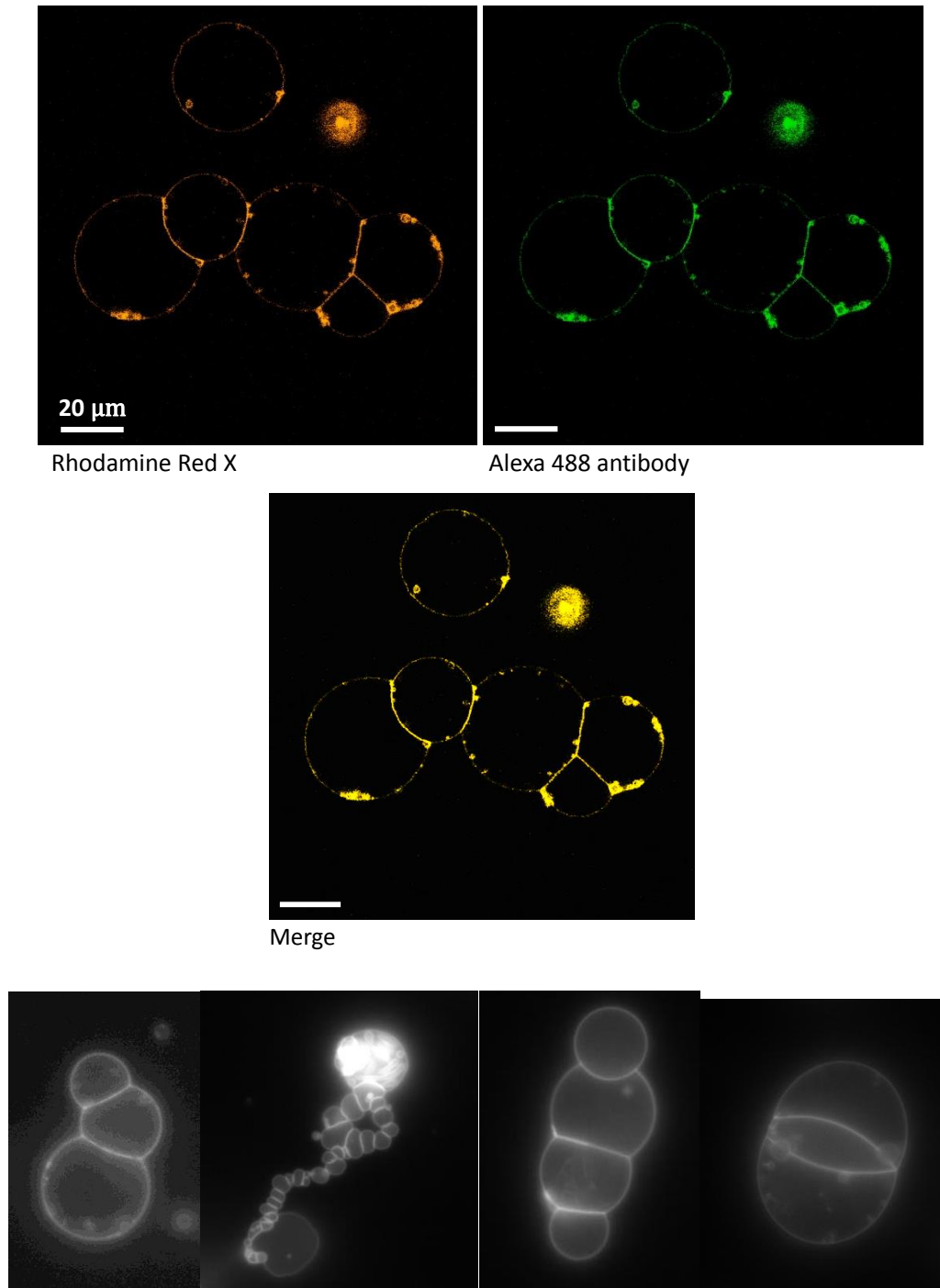


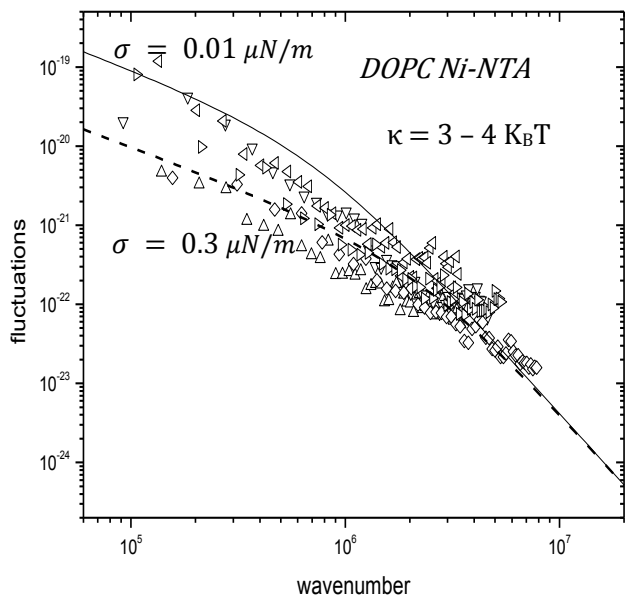
Figura 4-9: *Arriba*, muestra de un multiplete en sus canales de fluorescencia, Rhodamine Red X para el canal lipídico, Alexa 488 antibody para el canal de proteína y merge para la mezcla de los dos donde se ve más intensidad en las zonas de unión. *Abajo*, multipletes con las diversas geometrías presentes en las mezclas.

4.3.2. Espectros de fluctuaciones

Para poder calcular las propiedades mecánicas de las membranas en presencia/ausencia de proteína se recurrió a la técnica de análisis de espectro de fluctuaciones o *flickering*, en la que, como se comentó en el epígrafe (3.6.1.2) en el capítulo de materiales y métodos, se mide la fluctuación de la membrana como la variación local de la posición de la membrana en el plano ecuatorial.

A partir de dichas fluctuaciones, si se representan frente al vector de onda \mathbf{q} , se puede obtener el módulo de curvatura o *bending* (7). Este módulo nos indica la capacidad de deformación de una membrana, en este caso referente a las condiciones térmicas. El DOPC es uno de los lípidos más estudiados, posee un módulo de curvatura, κ , muy bajo, lo que significa que su membrana es muy flexible.

Al hacer el estudio con la mezcla de lípidos empleada de DOPC con Ni-NTA, se obtiene una rigidificación de la membrana, aumentando significativamente al añadir la proteína. Lo mismo ocurre con la tensión de la membrana.



	κ $K_B T$	σ $\mu N/m$
Lípidos	3 ± 1	0.01 ± 0.002
Lípidos + cadherina	8.3 ± 1	0.34 ± 0.04

Figura 4-10: Espectro de fluctuaciones para la mezcla de lípidos DOPC – Ni-NTA, donde se observa una pendiente de -1 en el régimen dominado por la tensión y -3 para kappa.

La variación en la tensión de la membrana se debe a la presencia de proteína en la misma. Las cadherinas, en presencia de iones Ca^{2+} , interaccionan entre sí en conformación *cis* formando los clústeres de cadherinas en la membrana. Estas interacciones provocan el aumento de la tensión así como la rigidez de la misma.

4.3.3. Dinámica de la adhesión

Se sabe que las proteínas, cuando están unidas, forman una *cremallera* de cadherinas, pero queremos conocer cuál es el mecanismo por el cual se forma esa cremallera.

Se pueden barajar dos opciones a partir de un punto de unión entre dos vesículas, o si lo trasladamos a terreno biológico, dos células. Una vía sería una dinámica de adhesión en bloque, es decir, un proceso cinéticamente muy rápido y otra vía sería una dinámica de adhesión más lenta, tipo *cremallera*, es decir, que existiera una difusión de la proteína en la membrana lipídica, no que estuvieran ya predeterminadas en sitios de unión específicos.

El procedimiento experimental para este estudio consiste en realizar un seguimiento de la adhesión de dos vesículas de un tamaño parecido que se han acercado para promover el contacto inicial adhesivo mediante manipulación con micropipetas. Se realizaron diversos seguimientos a distintas concentraciones⁺⁺⁺ mediante la grabación de vídeos. En ellos se observa cómo se acercan las dos vesículas y se inicia la adhesión a través de un punto de contacto (nucleación). Se ha observado una cinética exponencial relativamente lenta, la cual se estabiliza cuando se forma una unión prácticamente en ángulo recto. En la gráfica se representa esa variación de la longitud de adhesión frente al tiempo.

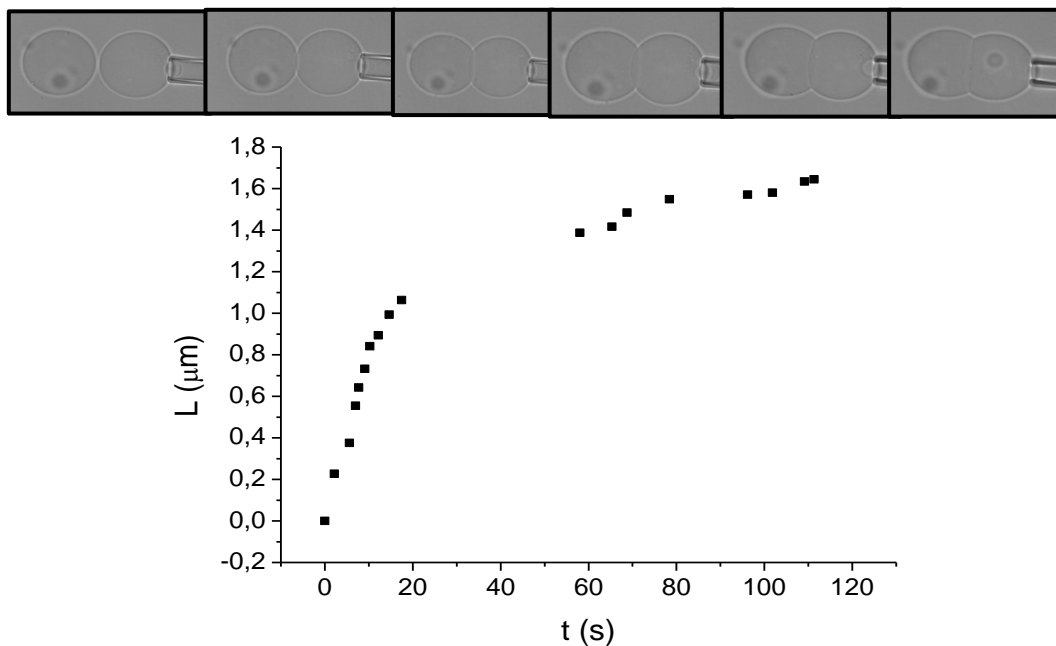


Figura 4-11: Experimento de la cinética de adhesión para dos vesículas de 30 μm en función de la longitud del contacto adhesivo.

⁺⁺⁺ Se entiende como concentración, o porcentaje, de cadherina como el porcentaje de lípido Ni-NTA que contiene la membrana.

Se ha realizado un estudio detallado a concentración constante de cadherina, de varios experimentos de adhesión y se observó que todas siguen un crecimiento de tipo difusivo, cuya pendiente se acerca a $t^{1/2}$. Todas llegan a un plateau L/D aproximado de 1, lo cual significa que la relación de la longitud de adhesión y el radio de la vesícula adherida es aproximadamente el diámetro de la misma, siendo de este modo la adhesión máxima.

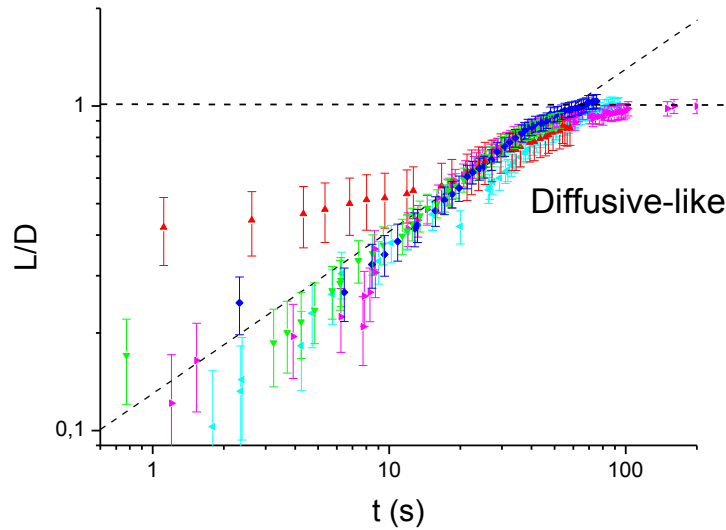


Figura 4-12: Comparativa de distintas tomas para la misma concentración del 5% en cadherina. Se observa que el régimen es de tipo difusivo. Todas llegan al mismo valor de máximo en un tiempo parecido.

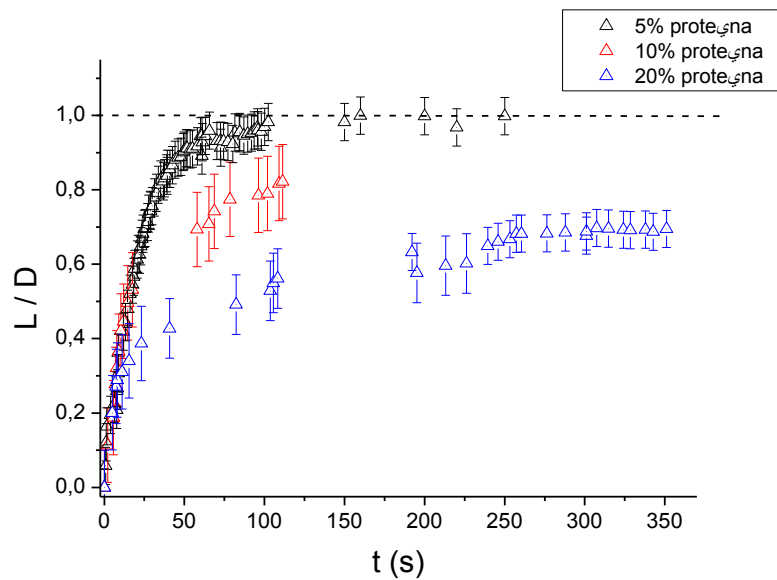


Figura 4-13: En esta gráfica se observan las curvas cinéticas de adhesión para los casos en los que el porcentaje de proteína es del 5, 10 y 20 %. Cabe destacar en el caso del 5 % la velocidad es mayor, hasta alcanzar el valor de *plateau* $L/D \approx 1$ que para los casos del 10% y 20%. Es debido a que, al haber mayor cantidad de proteína, y ser un proceso difusivo, como se vio en Figura 4-12, hay mayor densidad de proteína y su movimiento es más lento.

4.3.3.1. Adhesión reversible

Al realizar los experimentos de cinética de adhesión se ha observado que, una vez se había alcanzado el valor de *plateau* de dos vesículas gigantes unidas y ligadas a la micromanipulación, se puede realizar el proceso inverso, es decir, se pueden despegar sin perder sus propiedades adhesivas, ya que se pueden volver a unir. Este proceso de pegado – despegado de las vesículas se realiza mediante movimientos mecánicos de tracción, manteniendo siempre la misma variación de presión en la succión de las vesículas para no modificar la tensión de la membrana, es decir, las micropipetas, en estos experimentos, se emplean como pinzas para acercar dos vesículas, no como método de medición.

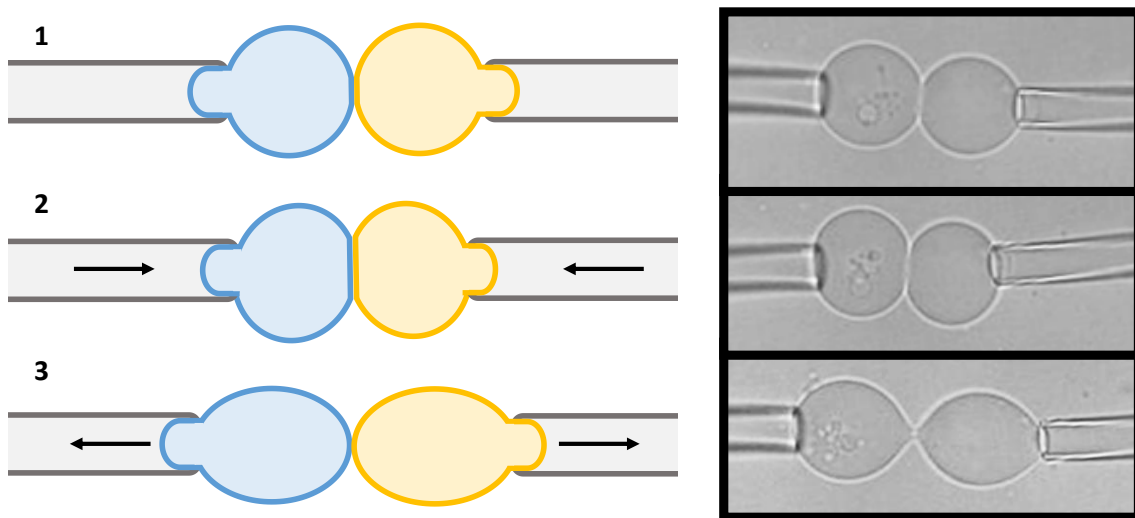


Figura 4-14: Imágenes representativas del pegado – despegado de dos vesículas sujetas con micropipetas.

Como se observa en la figura 4-14, al realizar el experimento de despegado, las vesículas modifican su forma, pasando de tener una geometría circular a una deformada, manteniendo un punto de unión fuerte (figura 4-14-3), hasta su total despegado.

Si en lugar de emplear una fuerza de tracción se realiza una fuerza de succión por la aspiración con micropipetas controlada por un motor, mediante el cual se generan cambios en la tensión de la membrana al variar la presión en el interior de la pipeta, no se logran separar por completo las dos vesículas unidas por cadherinas, sino que llega a romperse la vesícula que mayor presión soporta (vesícula 2, Figura 4-15) antes que se lleguen a separar debido a la fuerza de ese contacto adhesivo.

Para la realización de los cálculos nos hemos basado en los experimentos realizados por E. Evans et al (8; 9) en los que se obtiene el exceso de área en función de los parámetros geométricos de la vesícula y la pipeta:

$$4-9 \quad \Delta\alpha = \alpha - \alpha_0 = \left[\left(R_p/R_v \right)^2 - \left(R_p/R_v \right)^3 \right] \Delta h / 2R_p$$

$$\Delta\alpha = \left[\left(D_p/D_v \right)^2 - \left(D_p/D_v \right)^3 \right] \Delta h / D_p$$

Siendo Δh la variación de la altura en el depósito de agua, que se puede transformar en una variación de presión $\Delta P = \rho g \Delta h$. La variación de la presión se relaciona con la tensión de la membrana sometida a un estiramiento:

$$4-10 \quad \sigma = \Delta P \frac{D_p}{4[1-D_p/D_v]}$$

Se ha realizado la monitorización de la variación de la longitud del contacto adhesivo con el diámetro de la vesícula 2, frente a la variación del área en exceso de la membrana de dicho experimento, y se ha observado un cambio en la pendiente en $\Delta\alpha \approx 0.05$, donde la relación de la longitud de adhesión y el diámetro de la vesícula es mínimo, hasta alcanzar un máximo cerca de la relación $L/D \approx 1$. Ese mínimo indica que el régimen está dominado por la energía de adhesiva del sistema, al ser mayor la energía de adhesión que la tensión producida por el aumento de la variación de la presión, la vesícula 2 se deforma hasta llegar a la ruptura.

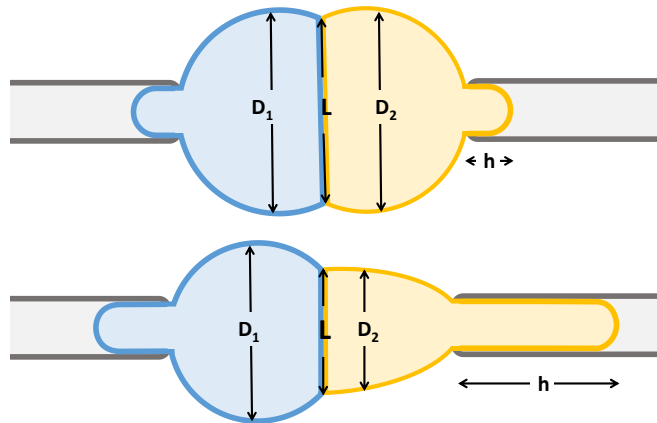


Figura 4-15: Esquema del experimento de succión con micropipetas de dos vesículas adheridas.

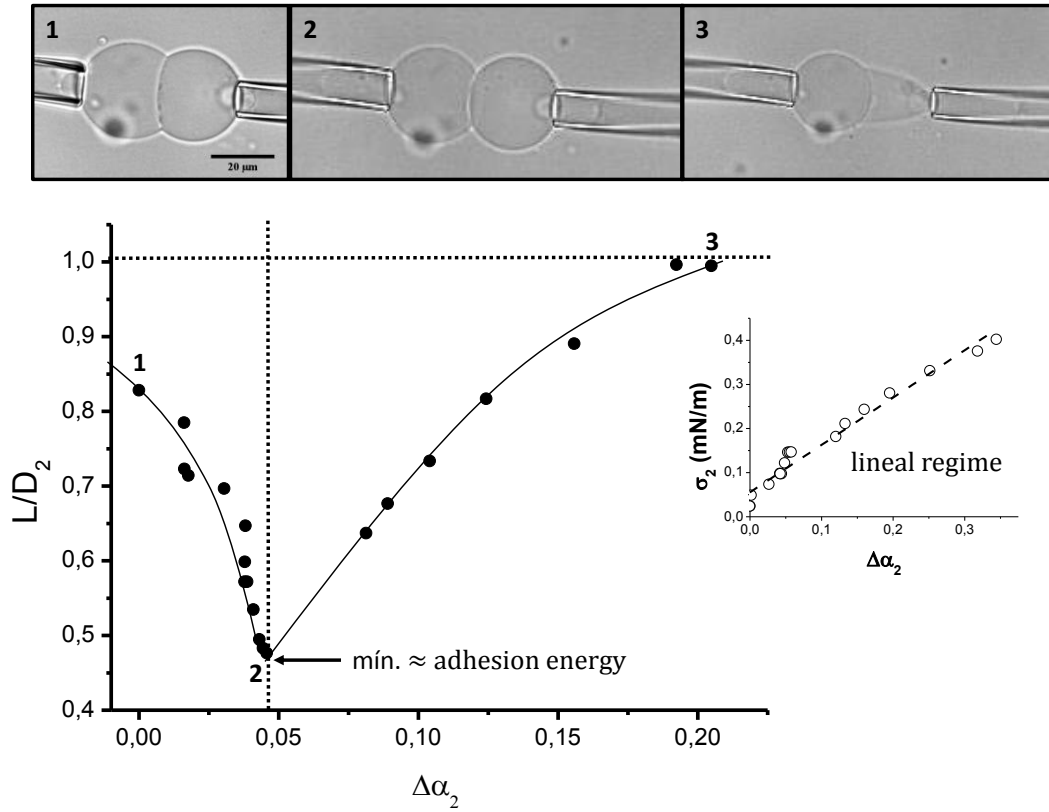


Figura 4-16: Representación gráfica de la variación del contacto adhesivo respecto al diámetro de la vesícula adherida en función del área en exceso, donde se observa un cambio de régimen debido a la energía de adhesión. En la gráfica insertada se observa que la tensión de la membrana sigue un régimen lineal respecto al área en exceso, lo cual indica que el cambio de régimen en la gráfica anterior no depende de la tensión de la membrana. *Arriba* se muestran las fotografías de las distintas fases de la adhesión.

4.3.4. Energías adhesivas

Con todo ese desarrollo del análisis de resultados llegamos a comparar la diferencia entre vesículas que presentan una adhesión específica, es decir las *GUVs* que contienen DOPC y Ni-NTA; y en presencia de Ca^{2+} y proteína; frente a la adhesión inespecífica, es decir, las *GUVs* adheridas mediante interacción de calcio, sin proteína.

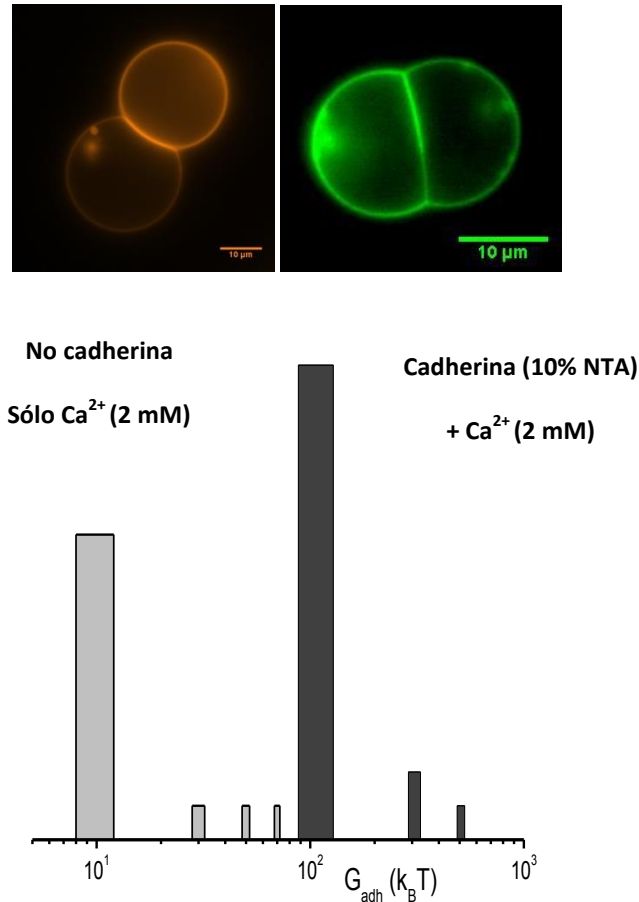


Figura 4-17: abajo, gráfica donde se muestran las energías adhesivas en función de la concentración de proteína expresada en porcentaje de lípido Ni-NTA donde se observa la gran diferencia entre un sistema dominado por una adhesión inespecífica, mediada por un catión divalente, y por un sistema dominado por una adhesión específica mediada por cadherinas. Arriba se muestran las imágenes típicas de los dos tipos adhesivos.

Para poder obtener una mayor información se realizaron los experimentos con variación de la cantidad de proteína en las membranas mediante la variación de la cantidad de NTA en las mismas. Se tomaron concentraciones desde el 0% hasta el 20%. A partir del 20% se obtenían agregados morulares, es decir, para más de dos vesículas, por lo que no se tomaron en cuenta para el estudio energético.

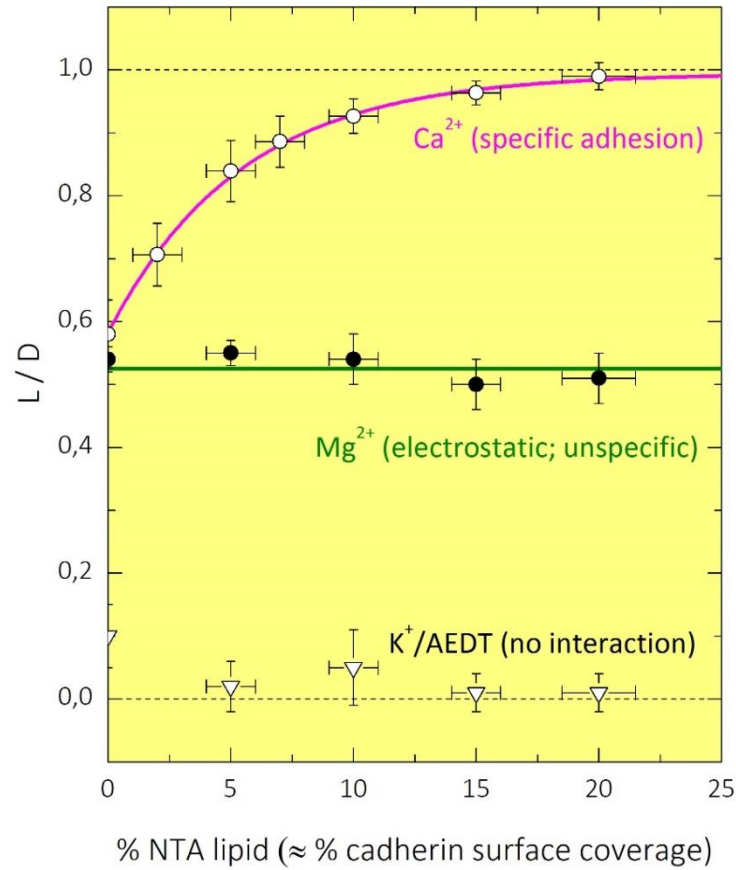


Figura 4-18: Representación de la variación de la longitud adhesiva respecto al diámetro de la vesícula en función de la cantidad de proteína expresada como el porcentaje de lípido Nli-NTA para los distintos experimentos realizados, adhesión específica (cadherina en presencia de iones calcio), inespecífica (presencia de iones magnesio), y de no adhesión (presencia de iones monovalentes o agentes quelantes de calcio).

En una primera aproximación se ha realizado el estudio de los ángulos de contacto de distintas concentraciones en los dobletes de GUVs. Como ya se muestra en la Figura 4-5 la principal diferencia entre una adhesión específica y una inespecífica son los ángulos de contacto adhesivos. Al añadir proteína, se observa que los ángulos son más cercanos a 90° que en ausencia de la misma, cuyos ángulos son cercanos a 30° , eso nos da a entender que la adhesión específica mediada por cadherinas que tiene lugar y que la superficie de adhesión es mayor a mayores cantidades de proteína, y por lo tanto, la adhesión es más fuerte.

Para conocer la energía total de adhesión, o la energía de Gibbs de adhesión, se debe tener en cuenta el área de contacto entre las dos vesículas que viene determinada por la longitud de adhesión. Para la realización de los cálculos energéticos se siguió el procedimiento descrito en el epígrafe 4.2.2. Realizando un promedio energético para cada concentración de proteína, se observa un aumento de la energía de adhesión alcanzando un valor de *plateau* cuyo orden de magnitud es $\sim 10^4 k_B T$.

A mayor concentración de cadherina, las fuerzas de adhesión son mayores, por lo tanto, también lo son las energías de adhesión.

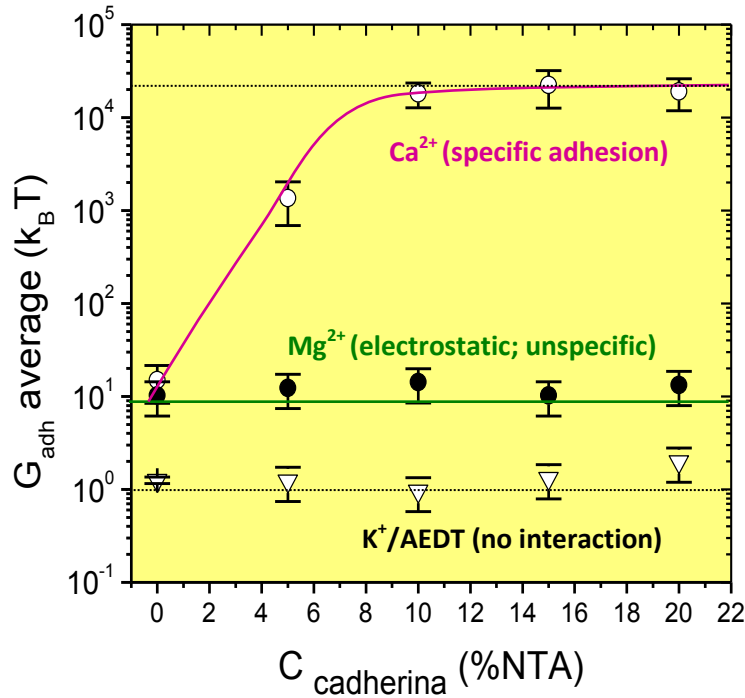


Figura 4-19: Representación de las energías de adhesión para distintas concentraciones de cadherina expresadas en función del porcentaje de lípido Ni-NTA presente en la membrana. Se observa un aumento de la energía que se estabiliza a partir del 10 %, donde parece que la proteína de la muestra está en exceso y es por ello que a mayores concentraciones son más frecuentes los multipletes que los dobletes con los que somos capaces de estudiar la energía adhesiva.

Cabe destacar que en las uniones electrostáticas o inespecíficas, si se varía la concentración de cadherina, permanece con un valor aproximado de $10 k_B T$, mientras que en presencia de iones monovalentes, como el potasio, o en presencia de agentes quelantes de calcio (AEDT), los valores son muy prácticamente $0 k_B T$, al no haber adhesión.

Estos datos energéticos nos reafirman la importancia de las proteínas de adhesión en procesos celulares, teniendo en cuenta que, estructuralmente, es un estudio básico, es decir, sólo se tiene en cuenta el ectodominio de la proteína y no el fragmento transmembrana, y por lo tanto, no se tienen en cuenta las interacciones con el citoesqueleto celular.

4.3.5. Caracterización microscópica estructural

Para profundizar en los contactos adhesivos se han realizado experimentos mediante la técnica de microscopía *cryo-TEM*, descrita en el epígrafe 3.6.3, del capítulo de materiales y métodos. Para ello se redujo el tamaño de las muestras, es decir, se realizaron vesículas unilamelares grandes (LUVs), del orden de 100 — 200 nm, para poder estudiar cómo se organizan las cadherinas en los contactos adhesivos, en presencia de nanopartículas de oro para una posterior caracterización estructural.

En los resultados se pueden observar estructuras prácticamente poligonales debido a la fuerza del contacto adhesivo. En los espacios adhesivos se ven las cadherinas formando cremalleras en zonas ya organizadas como se observa en la Figura 4-21 *a*, *b*, *d* y *f*, y hay zonas en las que se observa la cadherina en estado “libre” comenzando a formar cremalleras como se ve en la Figura 4-21 *c* y *f*. En la Figura 4-21 *g* se ven las cremalleras de cadherina, en la ampliación, donde se ve lo que parece un patrón de repetición en la colocación de las proteínas.

En la Figura 4-20 se encuentra representada la caracterización estructural, realizada en el laboratorio del Dr. José María Valpuesta, como imagen promedio de unas 500 partículas unidas a la membrana. De la imagen se puede obtener un valor aproximado de las dimensiones de la cadherina, que tiene 90 Å de altura y 45 Å de anchura, con una parte inserta en la membrana. Se ha medido la membrana y tiene un valor de unos 50 Å, lo que está de acuerdo a los valores normales. Se observa que las cadherinas se distribuyen de manera periódica en la membrana con un espaciado de 80 Å entre sí y esto es regular en muchos sitios.

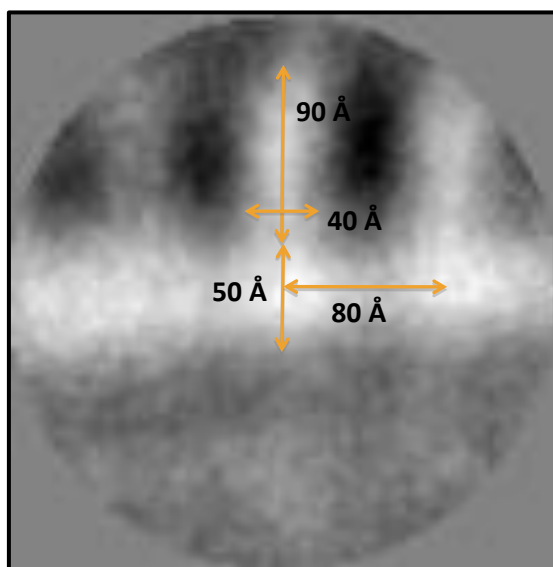


Figura 4-20: Caracterización estructural de la unión entre dos membranas mediante cadherinas.

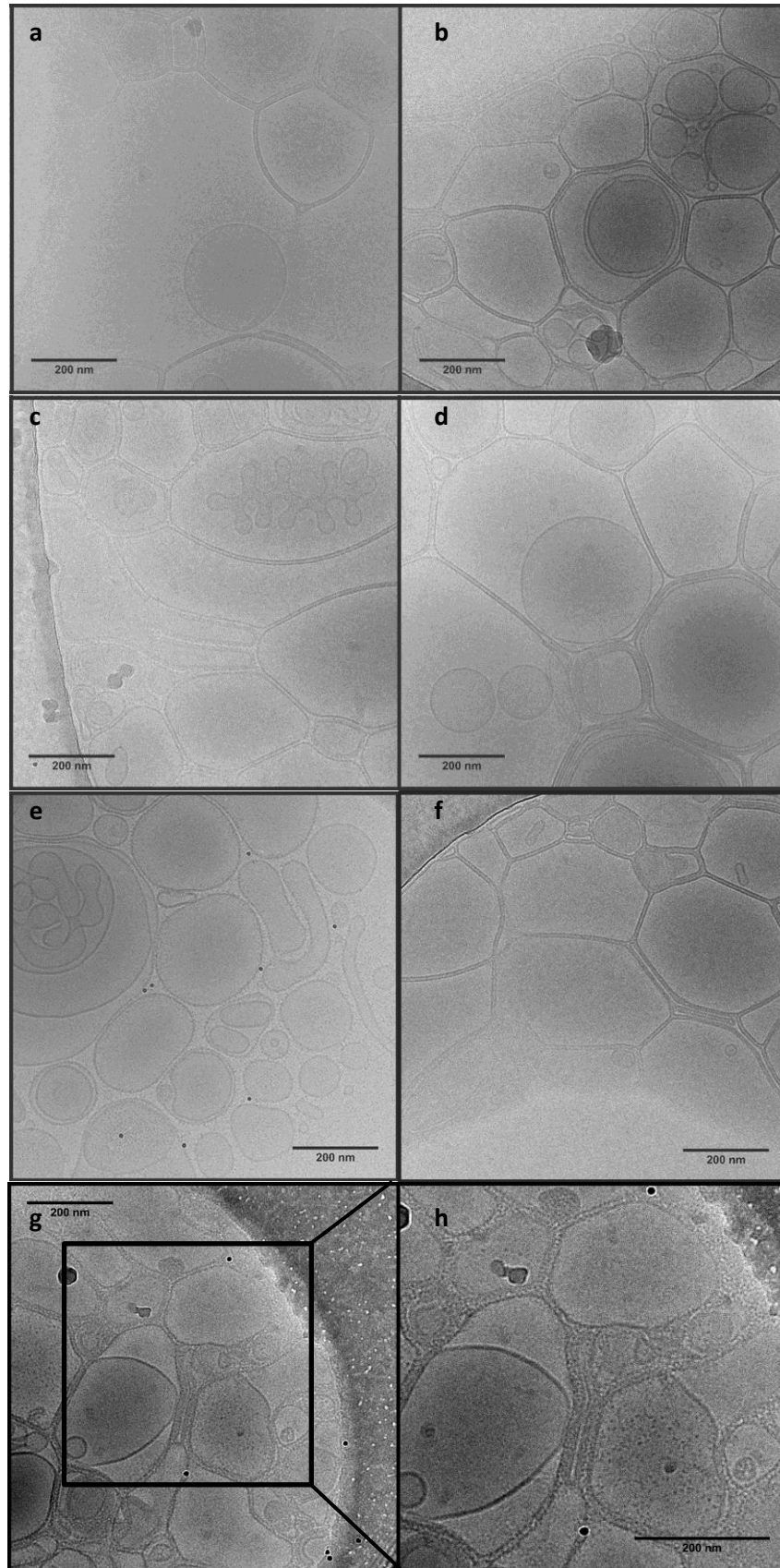


Figura 4-21: Imágenes de crio-microscopía electrónica de transmisión para muestras de liposomas en presencia de proteína donde se observan bordes rectos debido a las adhesiones entre los liposomas, con la formación de cremalleras de cadherinas. Estas muestras se realizaron en condiciones de alta concentración de proteína con un 30% de lípido Ni-NTA.

4.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha logrado el pegado de la proteína a una vesícula a través de una interacción con el lípido NTA mediante un enlace covalente coordinado entre el Ni-NTA y el *tag* de seis histidinas. Se ha mostrado la importancia de los cationes calcio frente a las interacciones inespecíficas, ya sea en ausencia de cadherina (interacción electrostática), o en presencia de cadherina (interacción específica), frente a iones monovalentes (K^+) o divalentes (Mg^{2+}) cual sería la interacción electrostática de las *GUVs*; como en los procesos de adhesión específica, en los que la presencia de calcio aporta funcionalidad al ectodominio de la cadherina, con su consecuente incremento en las fuerzas de adhesión y por lo tanto, energías de adhesión.

La energía de adhesión de membrana regulada por cadherina resulta enormemente favorable en presencia de Ca^{2+} . La interacción adhesiva está caracterizada por una energía elevadísima, de orden de $10^4 k_B T$, a densidades de proteína suficientemente altas.

Se ha observado la reversibilidad de la adhesión de cadherinas frente a acciones mecánicas o mediante la eliminación de los iones Ca^{2+} del medio con agentes quelantes, pudiendo emplearse como biomaterial adhesivo.

Se ha obtenido la microestructura de la unión del ectodominio entre vesículas mediante la técnica de *Cryo-TEM*, observándose una cierta continuidad y espaciado en los clúster de cadherinas.

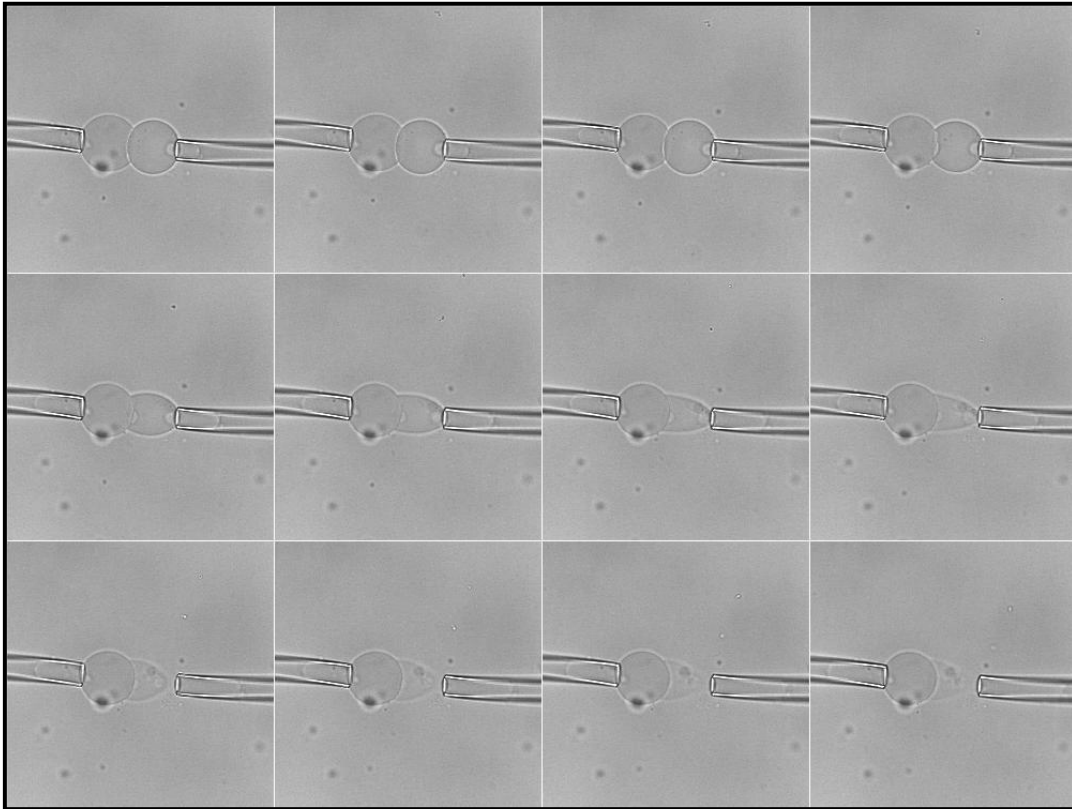
Se podría aventurar a decir que el calcio, no sólo da la funcionalidad a la proteína, sino que es probable que éste medie la adhesión, aproximando las dos membranas y disminuyendo las fuerzas de repulsión de la doble capa eléctrica, y una vez superada esa distancia dé comienzo la adhesión específica con una cinética que se podría decir que es difusiva de tipo cremallera.

4.5. AGRADECIMIENTOS

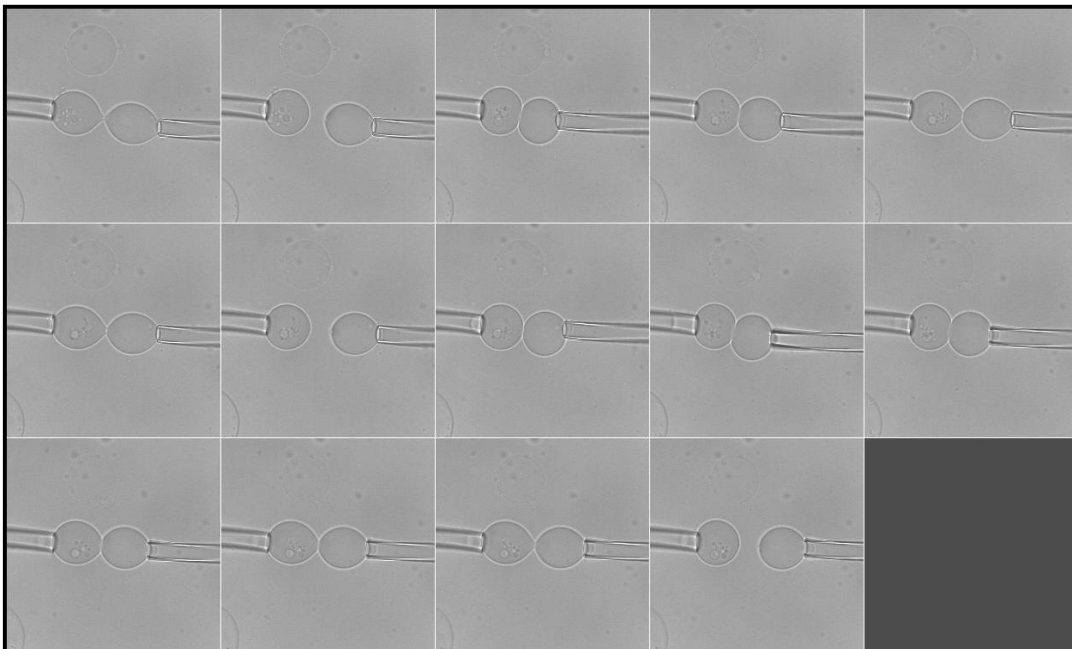
Me gustaría terminar el capítulo agradeciendo a las personas que han hecho posible este trabajo. En primer lugar agradecer al Dr. Mariano Carrión, Dr. Javier Oroz y al Dr. Rubén Hervás por aportar la proteína necesaria para desarrollar este trabajo. En segundo lugar agradecer a la Dra. Rocío Arranz y al Dr. José María Valpuesta por prestarnos el servicio de microscopía electrónica, sobre todo a la Dra. Rocío Arranz por pasar largas horas delante del microscopio. Al Dr. Iván López Montero por la gran ayuda prestada en el desarrollo en la técnica de manipulación con micropipetas, a la Dra. Lara Hernández Moleiro por la ayuda en el desarrollo de las fórmulas para poder calcular la energética de los procesos adhesivos y al Dr. Ruddi Rodríguez por desarrollar el programa de detección de contorno. Por último agradecer al Ldo. Víctor G. Vedía por su ayuda prestada en la manipulación del microscopio confocal.

Anexo: Colección de Imágenes de Experimentos

- Experimentos de succión de dos vesículas adheridas



- Experimento de tracción entre dos vesículas (adhesión – no adhesión)



REFERENCIAS

1. **Alberts, Bruce, y otros, y otros.** *Molecular Biology of the Cell*. 5. s.l. : Garland Science, 2008.
2. **Karp, Gerald.** *Cell and molecular biology. Concepts and experiments*. United States of America : John Wiley & Sons, Inc, 2010.
3. *Mutual adhesion of lecithin membranes at ultralow tensions.* **Helfrich, R.M. Servuss and W.** 1989, Journal de Physique, Vol. 50, págs. 809-827.
4. **Boal, David.** *Mechanics of the Cell*. Segunda edición. United Kingdom : Cambridge University Press, 2012.
5. *Adhesive Interactions between Vesicles in the Strong Adhesion Limit.* **Arun Ramachandran, Travers H. Anderson, L. Gary Leal, and Jacob N. Israelachvili.** 1, 2010, Langmuir, Vol. 27, págs. 59–73.
6. *Intrinsic Contact Angle of Aqueous Phases at Membranes and Vesicles.* **Halim Kusumaatmaja, Yanhong Li, Rumiana Dimova, Reinhard Lipowsky.** 23, 2009, Physical Review Letters, Vol. 103, pág. 238103.
7. *Subdiffusive fluctuation dynamics of rigid membranes as resolved by ultrafast videomicroscopy.* **R. Rodríguez-García, M.Mell, I. López-Montero, F. Monroy.** 2, 2011, Europhysics Letters, Vol. 94, pág. 28009 .
8. *Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers.* **K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham, E. Evans.** 1, 2000, Biophysical Journal, Vol. 79, págs. 321-327.
9. *Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers.* **W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, E. Evans.** 1, 2000, Biophysical Journal, Vol. 79, págs. 328-339.
10. *Three Functions of Cadherins in Cell Adhesion.* **Jean-Léon Maître, Carl-Philipp Heisenberg.** 2013, Current Biology, Vol. 23, págs. 626-633.

CAPÍTULO 5:

ESTUDIO REOLÓGICO DE LA ACTINA COMO PROTEÍNA DE CITOESQUELETO

En este capítulo se realiza el estudio de las propiedades mecánicas de sistemas modelo bidimensionales basados en actina mediante un doble abordaje experimental: una interacción suave entre la proteína de citoesqueleto y la membrana sintética, debida a interacciones puramente electrostáticas; y una interacción fuerte en la que no solo tienen lugar interacciones electrostáticas, también hay una aportación covalente a través de un punto de anclaje específico.

Este capítulo está basado en el artículo científico:

Silvia Isanta, Gabriel Espinosa, Ruddi Rodríguez-García, Paolo Natale, Iván López-Montero, Dominique Langevin y Francisco Monroy, "Active membranes with bound F-actin: sliding vs. sticking conditions" *Soft Matter*, 2011, **7**, 3100.

5.1. INTRODUCCIÓN

RELACION ENTRE CADHERINA Y ACTINA

Las uniones adhesivas (AJ⁺⁺⁺) son un tipo de adhesión célula-célula que se encuentra, no sólo en los tejidos epiteliales también en células no epiteliales como los fibroblastos, músculos cardíacos y neuronas. Las uniones adherentes conectan células resistiendo las fuerzas de disociación y también transmitiendo las fuerzas a las células vecinas, realizando aportaciones importantes a la morfogénesis de tejidos y a la homeostasis. Dan apoyo mecánico a la morfogénesis y se remodelan dinámicamente durante la embriogénesis, la regeneración de tejidos y reparación -de heridas, donde la asociación de las AJ con los tejidos de actina es fundamental. Pero, ¿cómo interaccionan los filamentos de actina con los componentes de la AJ con la molécula clave adhesiva, la cadherina?

Si nos basamos en observaciones ultraestructurales, las AJs se caracterizan por constituir una región en la interfase de dos células adyacentes con una separación entre las membranas de unos 20 nm, donde el espacio intercelular es atravesado por hebras moleculares, y con una densa capa asociada con los filamentos de actina en la superficie citoplasmática. Las AJs consisten en una membrana plasmática y una múltiple agrupación de proteínas. Una de las mayores moléculas adhesivas es la **CADHERINA CLÁSICA**. Las cadherinas se unen con la catenina p120 y β -catenina en su región citoesquelética. La β -catenina se une a su vez con la α -catenina, formando el complejo **cadherina-catenina**. Este complejo es esencial para la adhesión célula-célula y para el desarrollo de las AJs. A través de estas proteínas, α -catenina puede unirse con los filamentos de actina lo cual es esencial para la interacción cadherina-actina. (1; 2)

Las AJs emplean sus conexiones con la red de actomiosina para remodelar las interacciones célula-célula y aportar una adhesión dinámica flexible durante la reparación de tejidos adultos y desarrollo embrionario.

El estudio del mecanismo de unión de la α -catenina con los filamentos de actina todavía no está del todo desarrollado, aunque hay varios autores que aportan hipótesis acerca del mecanismo. La importancia de este estudio se debe a que defectos en las juntas adherentes pueden llegar a producir patologías humanas, incluyendo el cáncer. (3)

Es por ello, que tras el estudio de las cadherinas como material adhesivo, nos decantamos a realizar el estudio de las propiedades mecánicas de la actina.

⁺⁺⁺ AJ (Adherent Junctions) o uniones adhesivas.

INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA

La **actina** es una proteína multifuncional capaz de polimerizar, bajo consumo de ATP en una reacción de hidrólisis a ADP, para dar lugar a filamentos dinámicos involucrados en un gran número de procesos de membrana y en el programa mecánico de todas las células eucariotas. El ensamblaje en el citoesqueleto de la membrana es esencial para el mantenimiento de la forma celular y las uniones intercelulares así como también está envuelta en procesos de movilidad celular como la citoquinesis, organización intracelular y tráfico vesicular. La propiedad de polimerización de actina globular a actina fibrilar es fundamental para la actividad biológica. Los filamentos de actina al polimerizar adquieren una conformación de doble hélice proporcionando gran rigidez. Bajo el consumo de ATP estos filamentos tienen un comportamiento de polímero vivo al realizar el movimiento de “*treadmilling*” desarrollando un trabajo mecánico efectivo tal como se realiza en una cinta rolante de gimnasio.

La reología de los geles de F-actina ha sido ampliamente estudiada por muchos grupos de investigación los cuales han puesto en evidencia la clave entre las estructuras macroscópicas, como son la longitud de los filamentos, la densidad de entrecruzamiento, etc., y la mecánica. La microreología moderna ha revelado que las propiedades mecánicas de los geles de actina están controladas por los procesos dinámicos del “*treadmilling*”. Sin embargo, los experimentos reológicos que conciernen a las estructuras de actina en las membranas celulares, son más escasos. Los experimentos realizados *in vitro*, con concentraciones cercanas a la concentración crítica, la F-actina forma una red cortical, el córtex, capaz de resistir a deformaciones por cizalla. La mecánica de la membrana no sólo depende de las características estructurales del córtex, también depende de la naturaleza específica de la unión del elemento con la membrana. En experimentos *in vivo* se ha observado que el acoplamiento a la membrana se realiza a través de varias familias de proteínas, principalmente talina y anquirina, que producen la unión específica de la actina con proteínas integrales de membrana. Los anclajes simples de la actina con la membrana, como es la *hisactofilina*, combina las fuerzas electrostáticas con el anclaje hidrofóbico.

En este capítulo se ha realizado el estudio de la interacción directa de la actina con las membranas lipídicas a través de uniones simples, ya sea mediante la unión por fuerzas electrostáticas, o por la combinación de las mismas con una unión covalente artificial. El objetivo principal de este trabajo es diseñar un modelo *in vitro* para producir un tipo de unión fácil de la actina con las membranas y aportar un estudio comparativo de sus propiedades mecánicas, en particular de la fluidez, en términos de la naturaleza de la unión con la membrana. De hecho, la polimerización de la actina puede llegar a afectar al carácter “activo” de la membrana mientras se encuentre unida a ella.

Para abordar este trabajo se consideraron dos tipos de escenarios de unión: (a) la *unión electrostática*, en la que las fibras de actina tienen libertad de movimiento frente a un estrés lateral, y (b) la *unión covalente*, donde las fuerzas de unión a la membrana son complementadas mediante puntos de unión covalente capaces de mantener unida la actina a la membrana. A pH fisiológico (7.4), cada monómero de actina presenta un exceso de carga negativa y la unión de los filamentos de actina puede ser mediada mediante la interacción con una monocapa con carga neta positiva. Como ejemplo de este tipo de interacción electrostática actina-monocapa, en este trabajo se ha estudiado la unión electrostática de la actina polimerizada con monocapas cargadas positivamente compuestas por un fosfolípido neutro 1,2-palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) y un lípido catiónico bromuro de 1,2-dioctadecilmetilamonio (DODA). Usando una estrategia similar a Renault *et al.* (1) y a Demé *et al.* (2), se han estudiado las propiedades de adsorción de la actina electrostáticamente unida a una monocapa con lípido cargado positivamente. Para aportar, aparte de la interacción electrostática, una unión covalente, se incluyó en la monocapa un lípido funcionalizado con un lipopolímero de PEG^{§§§} y con un grupo succinimida capaz de reaccionar con los residuos de aminoácidos de lisinas y cisteínas presentes en la actina. Desde un punto de vista sintético, esta propuesta tiene ventajas potenciales en cuanto a una bioquímica más sencilla además de evitar los anclajes voluminosos. Desde el punto de vista físico, si se logra una reconstitución funcional de un córtex artificial, los movimientos de actina dependientes de ATP pueden reflejar las características 'activas' en las propiedades de flujo de la membrana. Estudios realizados por Renault *et al.* (1) y Walder *et al.* (3) mediante técnicas de reología superficial de cizalla, realizaron un trabajo similar pero en un régimen de proteína concentrada, cerca de los valores críticos de proteína necesarios para formar una estructura de tipo gel ($c_p \approx 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Con el objetivo de obtener una evidencia de la actividad inducida por los filamentos de actina, nos hemos centrado en un régimen diluido, muy por debajo de dicha concentración de *maraña*. En este régimen diluido las propiedades de flujo de la membrana se espera que estén fuertemente afectados por la actividad de la actina, no siendo así cuando nos encontramos en un régimen concentrado donde predomina un estado rígido debido a la *maraña* de filamentos de actina.

En este trabajo se ha abordado el problema mediante distintas técnicas experimentales. Para el estudio cualitativo de la capacidad de unión de la actina con los distintos escenarios de anclaje, tanto electrostático como covalente, se realizaron GUVs con la técnica de electroformación descrita en el capítulo de “materiales y métodos”. Una vez observada la capacidad de unión de la actina en bicapas lipídicas de las composiciones antes mencionadas, se realizaron monocapas de Langmuir para el estudio de las propiedades mecánicas del impacto de la actina en los lípidos. Para el estudio reológico de las propiedades mecánicas de la actina se emplearon monocapas de Langmuir en experimentos isotermas de expansión-compresión y para el estudio de reología superficial de cizalla.

§§§ PEG = Polietilenglicol

5.2. ABORDAJE EXPERIMENTAL: *anclaje puramente electrostático vs covalente*

Como se mencionó en la introducción, para el estudio del tipo de anclaje de la proteína en la membrana se prepararon dos tipos de escenarios de unión. La matriz estructural se basa en el fosfolípido monoinsaturado (POPC) que forma tanto monocapas como bicapas estables. Se añadieron dos clases de lípidos funcionales para considerar tanto el anclaje electrostático como covalente de la capa de lípidos con la actina con carga neta negativa. El primer escenario que se consideró fue la adsorción electrostática, empleando el lípido catiónico (DODA) (7). Las capas se formaron con un 80% de POPC y un 20% de DODA (w/w).

Para poder observar el comportamiento de la actina en sistemas celulares miméticos, como son las vesículas unilamelares gigantes (GUVs), en un primer sistema se preparó una mezcla de POPC (80%) y DODA (20%), disuelta en cloroformo, y mediante la técnica de electroformación, se prepararon vesículas gigantes (GUV).

Para poder preparar las GUVs por electroformación se depositaron unas gotas de la mezcla de lípidos en la placa de ITO a una concentración de $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para la evaporación total el disolvente, se aplicó vacío durante una hora a las placas y tras la evaporación se procedió a formar la celda de electroformación. El interior de la celda se rellenó con una disolución acuosa de sacarosa 200 mM y se selló con una separación de 1 mm entre las dos placas conductoras. Se hizo pasar una corriente alterna durante 4 horas a una frecuencia de 8 Hz y un voltaje de 1.1 V. En los últimos 30 minutos se bajó la frecuencia a 4 Hz y se aumentó el voltaje a 1.5 V, favoreciéndose el despegado de las GUVs de las placas.

Una vez formadas las GUVs se incubó 1 mL con $15 \mu\text{L}$ de G-actina marcada fluorescentemente, llegando a la concentración final de $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, durante 2 horas a 4°C en presencia de la disolución tamponada de polimerización (F-buffer). Una vez incubado, se observó al microscopio de contraste de fases.

Para evitar que la actina se desnaturalizase o tuviera interacciones inespecíficas con interfases que no fueran membranas, como la interfase aire/agua, la inyección de la proteína, F o G-actina, siempre se realizó en presencia de la membrana lipídica. Para inducir su polimerización se empleó una disolución tamponada en presencia de MgCl_2 (2 mM) y KCl (100 mM). Para realizar la polimerización siempre se inyectará la proteína en la forma monomérica globular (G-actina) preparada en la disolución tamponada para la proteína globular (G-buffer) en la cámara de experimentación la cual tendrá presente la disolución tamponada de polimerización (F-buffer) a 20° .

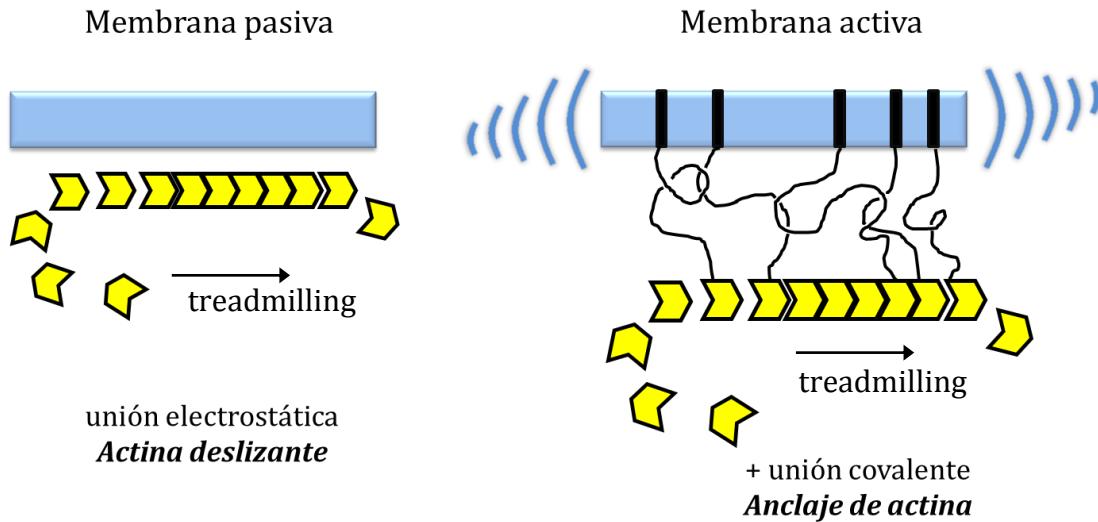


Figura 5.1-1: Dibujo esquemático del abordaje experimental. A la izquierda el esquema de la unión de tipo electrostático, donde la actina se une mediante la interacción de cargas. A la derecha el esquema de la unión electrostática + covalente, donde aparte de la interacción de las cargas de la membrana y la proteína hay un punto de anclaje covalente aportado por el Lip-NHS.

En el segundo sistema se incorpora un lípido para realizar el enlace covalente mediante la funcionalización con un grupo succinimida en la cabeza lipídica (*Lip-NHS*). Este lipopolímero tiene incorporada una cadena PEG (2 kDa) que permite que la cabeza reactiva de succinimida se oriente hacia la fase acuosa, siendo capaz de interactuar con los grupos amino laterales de los aminoácidos, y por lo tanto, siendo capaz de reaccionar con los grupos amino laterales expuestos de la actina. En este escenario covalente, se combinan un 70% de POPC, 20% de DODA y 10% de *Lip-NHS* (w/w). De este modo, la unión covalente con la proteína es más accesible debido a que, como aditivo, el lípido catiónico aporta una interacción no específica. El proceso de incubación una vez formadas las GUVs es el mismo que en el escenario electrostático.

5.2.1. Viscoelasticidad de compresión

Para el estudio de viscoelasticidad de compresión se empleó la balanza de Langmuir. La balanza de Langmuir es un dispositivo experimental para la preparación y caracterización de monocapas de Langmuir. Como se comentó brevemente en la introducción, la balanza de Langmuir está compuesta, esencialmente por una cubeta de un material inerte e hidrófobo (actualmente Teflón®), generalmente rectangular (puede dársele de distintas formas dependiendo de las necesidades de uso), de pocos milímetros de espesor. Dicha cubeta contendrá la subfase, generalmente acuosa, sobre la cual se formará posteriormente la monocapa, objeto de estudio. Por los bordes de la cubeta se deslizan dos barreras del mismo material que serán las encargadas de producir las variaciones de área que contiene la monocapa. Todo proceso debe estar mecanizado para evitar la formación de poros o grietas que puedan alojar material susceptible de contaminar el sistema y los distintos experimentos que se realicen o, en los bordes de la cubeta ya que por ellos se deslizarán las barreras y se evita tener errores experimentales de medidas de área o pérdidas del material producidas por la rugosidad de la super-

ficie en contacto. Todo ello puede conducir a la subestimación de la presión superficial o concentración superficial sobre el valor real.

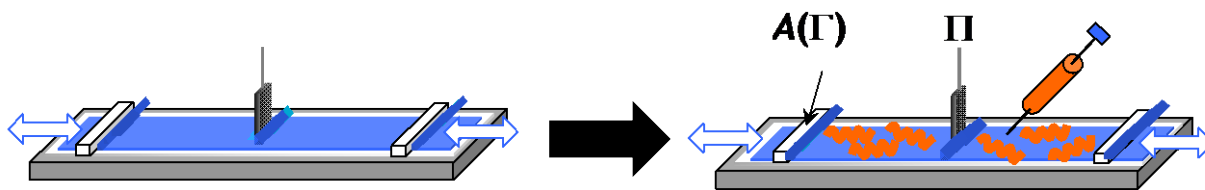


Figura 5.1-2: Procedimiento de inyección de lípidos sobre la superficie de la subfase antes de realizarse los experimentos.

Al inyectar la mezcla lipídica y tras evaporarse todo el disolvente volátil que contenía la mezcla de lípidos, de concentración conocida, se forma la monocapa en la superficie de la subfase y ésta ya puede ser comprimida o expandida deslizando las barreras por los bordes de la cubeta (Figura 5.1-2). El área geométrica (A) de la superficie ocupada por cada molécula anfifílica en la monocapa, nos da el área específica por molécula: $A = S/N$, y requiere el conocimiento en todo momento de la superficie disponible en la monocapa. Normalmente es una cantidad conocida con gran precisión a partir del volumen y la concentración de la disolución empleada para dispersar la mezcla lipídica sobre la superficie. Las disoluciones suelen prepararse en cloroformo (de calidad HPLC) y de concentración 1mg/mL y se dispensan sobre la superficie con microjeringas Hamilton de $(100,0 \pm 0,1) \mu\text{L}$. De este modo se añaden $v \mu\text{L}$ de mezcla con $g \text{ mg/mL}$ sobre la subfase cuya superficie libre es S , por lo que el área específica es:

$$(5.1-1) \quad A (\text{\AA}^2 / \text{molécula}) = (S (\text{cm}^2) \cdot M_W (\text{g/mol}) / (v (\mu\text{L}) \cdot g (\text{mg/mL}) \cdot N_A)) \cdot 10^{26}$$

Donde \overline{M}_W es el peso molecular promedio en peso.

La determinación de la presión superficial se detecta mediante la determinación de la tensión superficial mediante una placa de Wilhelmy con la que se establece un parámetro de $P = 2l$. Una placa de Wilhelmy es generalmente, una placa rectangular de platino o papel que entra en contacto con la superficie con un ángulo de contacto próximo a cero grados. Dicha placa se conecta a través de un vástago y un gancho a una microbalanza que determina con precisión la masa en microgramos. La tensión superficial se podrá obtener mediante la relación:

$$(5.1-2) \quad \gamma = \frac{F}{P} = \frac{mg}{2l}$$

En este experimento, la balanza que se empleó fue una balanza Langmuir comercial NIMA 702 BAM (NIMA Technology Co., UK) como la que se muestra en la Figura 5.1-3, para realizar las medidas de presión superficial-área (π - A) y los experimentos de barreras oscilatorias. El equipo se encuentra completamente computarizado y la temperatura se mantiene constante con una precisión de $\pm 0,1^\circ\text{C}$.



Figura 5.1-3: Balanza de Langmuir comercial NIMA 702 BAM

5.2.1.1. Experimentos de compresión-expansión: Curva σ - u

Las propiedades de transporte de los tensioactivos están dominadas por una propiedad denominada viscosidad superficial. Existen dos modos principales de movimiento: el transversal, o capilar, y el longitudinal, o dilacional, que corresponden al movimiento perpendicular y paralelo al plano superficial respectivamente, siendo posible modificar uno de ellos mediante una excitación externa. Dicha excitación se puede aplicar mediante el movimiento oscilatorio de las barreras, de modo que las componentes viscosas, correspondientes a los planos de fuera de la monocapa, resulten irrelevantes. Dichos experimentos se llevan a cabo a frecuencia constante de modo que la información reológica obtenida corresponde a la frecuencia de excitación.

La variación temporal del área responde a una ecuación sinusoidal de tal modo:

$$(5.1-3) \quad A(t) = A_0 + \Delta A \cdot \sin(\omega t + \phi_A) = A_0 + \Delta A \cdot \sin(2 \cdot \pi \cdot t / T + \phi_A)$$

Como respuesta a dicha deformación del área donde se encuentra confinada la monocapa, la presión superficial también sufre una deformación oscilatoria según:

$$(5.1-4) \quad \pi(t) = \pi_0 + \Delta \pi \sin(\omega t + \phi_\pi)$$

donde $\omega = 2\pi/T$; T es el periodo de la deformación.

Si la respuesta que se obtiene es lineal, es decir que dentro de la deformación la respuesta del sistema es directamente proporcional a la deformación externa aplicada, la constante de proporcionalidad entre el esfuerzo y la deformación es el módulo elástico:

$$(5.1-5) \quad \sigma = -\varepsilon \cdot u = -\varepsilon \cdot u_0 \cdot e^{i\omega t} = -\sigma_0 \cdot e^{i\omega t}$$

Siendo:

$$(5.1-6) \quad \sigma_0 = \varepsilon \cdot u_0$$

Capítulo 5

Si hay viscosidad hay más desfase. Dicho desfase se debe a la aportación elástica, ε_R , que viene gobernada por la Ley de Hooke, y a la disipación viscosa, $\eta \frac{\partial}{\partial t}$, gobernada por la Ley de Newton que es la componente imaginaria y representa el módulo de pérdidas y es proporcional a la viscosidad; η .

$$(5.1-7) \quad \varepsilon = \varepsilon_R + \eta \frac{\partial}{\partial t}$$

Así se puede escribir el esfuerzo:

$$(5.1-8) \quad \sigma_{total} = \varepsilon u = \varepsilon_R u + \eta \frac{\partial u}{\partial t} = \sigma_{elást} + \sigma_{visc}$$

donde $u = \Delta A / A_0$ y $\sigma = \Delta \pi$.

Pero para una deformación sinusoidal,

$$(5.1-9) \quad u = u_0 e^{i\omega t}$$

De este modo el esfuerzo tendrá una ecuación más complicada:

$$(5.1-10) \quad \begin{aligned} \sigma &= -\left(\varepsilon_R + \eta \frac{\partial}{\partial t}\right) u = -\left(\varepsilon_R u + \eta \frac{\partial u}{\partial t}\right) \\ \sigma &= -(\varepsilon_R u_0 e^{i\omega t} + \eta u_0 i\omega e^{i\omega t}) = -(\varepsilon_R + i\omega\eta) u_0 e^{i\omega t} \end{aligned}$$

Así se pueden obtener los módulos elástico y viscoso mediante las relaciones:

$$(5.1-11) \quad \tilde{\varepsilon} = \varepsilon_R + i\omega\eta = |\tilde{\varepsilon}| e^{i\phi}$$

$$(5.1-12) \quad \sigma = |\tilde{\varepsilon}| e^{i\phi} u_0 e^{i\omega t} e^{i\pi} = |\tilde{\varepsilon}| u_0 e^{i(\phi + \omega t + \pi)}$$

siendo el módulo elástico: $\varepsilon_R = |\tilde{\varepsilon}| \cos \phi$ (5.1-13), y el módulo viscoso $\omega\eta = |\tilde{\varepsilon}| \sin \phi$ (5.1-14).

donde $\phi = \phi_A + \phi_\pi + \pi$ (5.1-15) que es el desfase total y $|\tilde{\varepsilon}| = \left| \frac{\Delta\pi}{\Delta A / A} \right|$ (5.1-16).

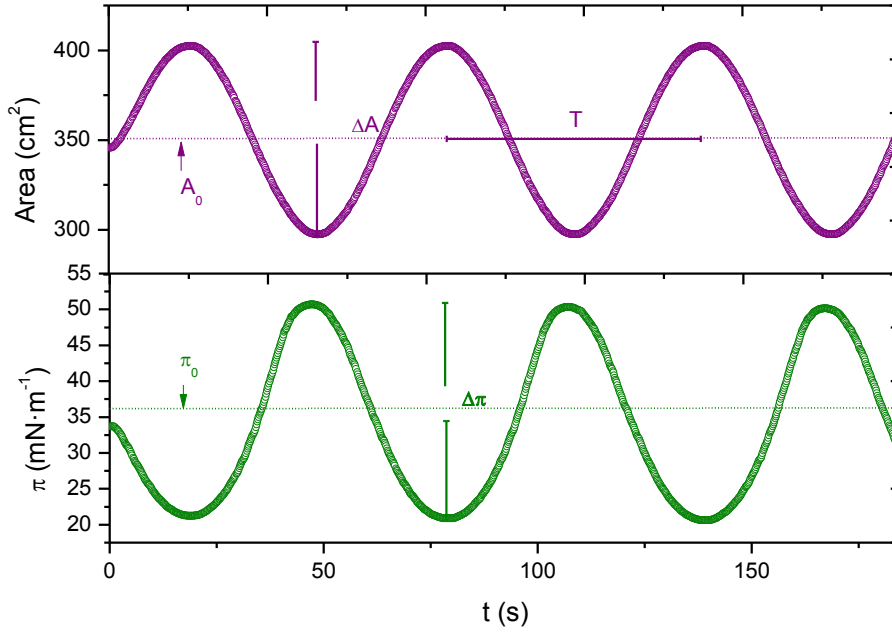


Figura 5.1-4: Representación de la deformación realizada a la monocapa mediante los experimentos de oscilación: área vs. tiempo sería la deformación aplicada y la presión vs. tiempo la respuesta del sistema a dicha deformación.

Si la respuesta es no lineal debido a una deformación demasiado grande o una velocidad de movimiento de las barreras muy elevada, sacando a la monocapa de su régimen lineal, la respuesta deja de ser proporcional a la deformación teniendo que introducir armónicos de orden superior con el fin de explicar el comportamiento reológico del sistema:

$$\begin{aligned}
 (5.1-17) \quad \sigma &= \varepsilon u + \varepsilon_2 u^2 + \varepsilon_3 u^3 \pm \dots \Rightarrow \\
 \sigma &= \varepsilon u e^{i\omega t} + \varepsilon_2 u^2 e^{2i\omega t} + \varepsilon_3 u^3 e^{3i\omega t} + \dots \\
 \sigma &= \sigma_1 e^{i\omega t} + \sigma_2 e^{2i\omega t} + \sigma_3 e^{3i\omega t} + \dots
 \end{aligned}$$

5.2.2. Viscoelasticidad de cizalla

Para los experimentos de reología de cizalla, se empleó un reómetro *Anton-Paar Physica* como se comentó en el capítulo 3 de Materiales y métodos.

En estos experimentos, el reómetro impone una deformación de cizalla sinusoidal en la interfase aire/líquido de modo que: $\gamma = \gamma_0 \exp(i\omega t)$, donde γ es la tensión superficial de la monocapa. La respuesta de torsión en el eje normal (σ) se mide con una precisión ($\delta\sigma \pm 10 \mu\text{N/m}$). Si se detecta la respuesta al esfuerzo de manera sistemáticamente ruidosa ($\sigma < \delta\sigma$), el software interpreta los datos como erróneos, por lo tanto se rechaza de forma automática para los análisis posteriores. En el régimen lineal, el esfuerzo interfacial de cizalla está compuesto por una componente elástica instantánea $\sigma_E = \gamma_0 G' \exp i\omega t$ determinado por el módulo de almacenamiento G' más un esfuerzo de flujo retardado $\sigma_v = \gamma_0 G'' \exp \omega t$, determinado por el módulo de pérdidas G'' . La respuesta total a la deformación está dada por $\sigma(t) = \sigma_E + \sigma_v$, o lo que es lo mismo, $\sigma(t) = \gamma_0 (G' + iG'') \exp(i\omega t)$.

La viscosidad superficial de cizalla se define como $\mu = G''/\omega$, y se mide como el esfuerzo necesario para hacer que la monocapa fluya a una velocidad de cizalla $\dot{\gamma} = \gamma_0 \omega$. Las interfases fluidas pueden llegar a comportarse como un fluido Newtoniano, es decir, caracterizado con una rigidez de cizalla nula ($G'=0$) y una viscosidad constante. Siguiendo el procedimiento habitual para la formación de monocapas de Langmuir, el estado de empaquetamiento determinado se alcanza por la adición gota a gota de moléculas en disolución orgánica, una vez se evapora el disolvente, se coloca el bicono sobre la interfase y la monocapa se pre-cizalla durante unos 10 minutos a una frecuencia fija (típicamente 1 s^{-1} , el 1% de amplitud de cizallamiento) para eliminar las inhomogeneidades provocadas por la evaporación del disolvente, hasta que se obtiene un registro constante de los parámetros viscoelásticos. A pesar de la alta resolución en las mediciones de la torsión, la reproducibilidad experimental está limitada, como en el caso de reología de compresión, por la capacidad de reproducir estados de monocapa idénticos en diferentes experimentos ($\delta G \approx \pm 1 \text{ mN/m}$). Así, la resolución del instrumento MCR 301 es 0.010 mN/m para el esfuerzo interfacial de cizalla. La respuesta viscoelástica de las monocapas se monitorizó en función del tiempo bajo una deformación constante con una amplitud del 1% y una frecuencia angular de $2\pi \text{ s}^{-1}$.

5.3. RESULTADOS

Para poder realizar los estudios en los distintos sistemas planteados en la introducción, se deben realizar los estudios de los estados de referencia. Para ello se consideran las isoterms de compresión de las monocapas de Langmuir que representan los dos escenarios de anclaje para la actina. En la Figura 5.1-5, izquierda, se muestra la isoterma de compresión de una monocapa formada por POPC mezclada con el lípido cargado DODA y con el lípido de anclaje covalente *lip-NHS*. En el primer caso se observa una isoterma expandida típica para una fase de lípido desordenado.

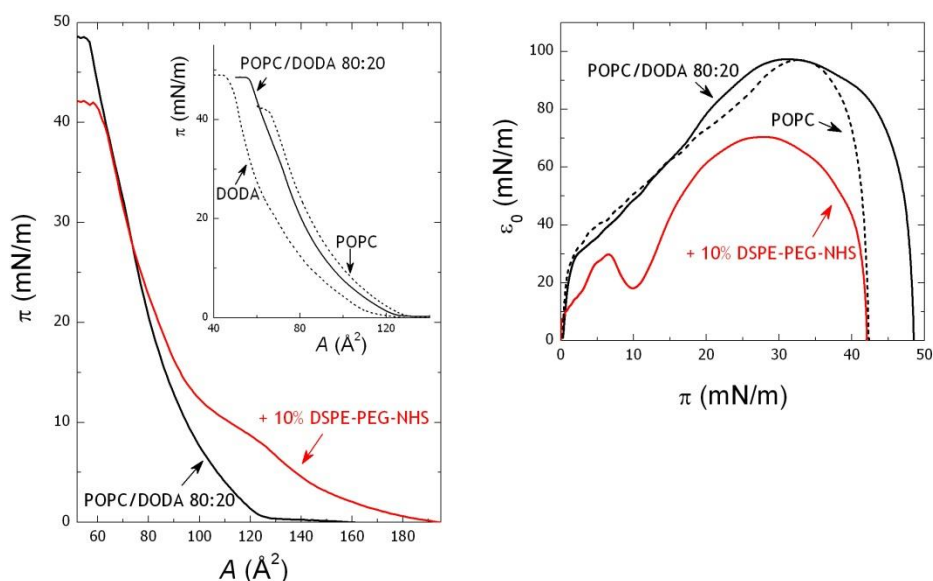


Figura 5.1-5. Izquierda, isoterma de compresión π - A de las monocapas de lípidos considerados en este estudio (línea negra, a 22°C y con una velocidad de compresión de 0.03 min⁻¹). Derecha, módulo de compresión calculado como la derivada numérica de la curva π - A (línea roja).

Esta isoterma es el intermedio entre la isoterma del fosfolípido monoinsaturado zwitteriónico (POPC) y el surfactante catiónico completamente saturado (DODA) (ver la figura insertada en Figura 5.1-5). El colapso tiene lugar cuando se alcanza un promedio de área por molécula de 55 Å², que se encuentra entre las isotherms de los dos lípidos, y a una presión superficial de 48 mN·m⁻¹, mayor que el POPC que está alrededor de los 42 mN·m⁻¹, pero es igual a la presión de colapso del DODA. Este comportamiento resalta la importancia de las interacciones coulombicas entre los lípidos cargados con empaquetamientos altos. La adición del Lip-NHS provoca una significativa expansión de la monocapa (ver Figura 5.1-5). En este caso, la transición de plató se observa, con claridad, a una presión intermedia ($\pi_p \approx 10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) que es muy cercana a la transición de empaquetamiento de los polímeros PEG (4; 5; 6). Luego volvió al estado expandido para áreas promedio menores a 100 Å². En este estado, las cadenas de

PEG se conforman a modo “cepillo” (*grafted*) en la subfase acuosa. Finalmente, las monocapas colapsan en el estado de empaquetamiento compacto de lípidos con una $\pi \approx 42 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ y $A \approx 55 \text{ Å}^2$.

En la gráfica de la derecha, en la Figura 5.1-5, se muestra el módulo de compresión, calculado mediante la derivada de las presiones superficiales, obtenidas en la gráfica de la izquierda, respecto al área:

$$\varepsilon_0 = -\left(\frac{1}{A}\right)\left(\frac{d\pi}{dA}\right)_T$$

A la presión relevante del empaquetamiento de la bicapa, $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ (4; 5), la monocapa formada por POPC/DODA se caracteriza por el módulo de compresión relativamente alto, $\varepsilon_0 \approx 100 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. Estos valores experimentales son muy similares a los encontrados en otras monocapas de lípidos fluidos (4). La inserción del Líp-NHS provoca un reblandecimiento significativo que se traduce en una disminución de ε_0 . En este caso existen dos regímenes a ambos lados del valor de plató de transición: a) a bajas presiones ($\pi \leq 10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, $\varepsilon_0 \leq 30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) el régimen de polímero blando se caracteriza por la elasticidad entrópica de la fracción polimérica (5; 6) b) a altas presiones ($\pi > 10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) el régimen rígido está controlado por el alto empaquetamiento de los lípidos. Sin embargo, debido al desorden estructural inducido por el PEG, el estado rígido es relativamente blando respecto al lípido puro.

5.3.1. Experimentos de viscoelasticidad de compresión

5.3.1.1. Interacción electrostática.

En primer lugar, se realizó un estudio de la capacidad que tiene la capa catiónica de incorporar actina electrostáticamente (4). Con la mezcla de POPC (80%) y DODA (20%) se prepararon vesículas gigantes (GUV)^{****}. En el microscopio de contraste de fases se observó que las vesículas eran predominantemente pequeñas y algunas de ellas estaban fusionadas de un modo irregular. En la imagen de fluorescencia se puede observar la presencia de proteína en la membrana, en la zona de fusión. El nivel de intensidad de fluorescencia fue bajo en las zonas de bicapa simple, mostrando la interacción electrostática relativamente débil en condiciones de fuerza iónica alta (100 mM de KCl). Sin embargo, en ausencia del lípido catiónico no se observó ninguna incorporación de la proteína a la membrana, siendo esto coherente debido a que el POPC es un lípido zwitteriónico con una capacidad de adsorción débil. (Figura 5.1-6).

^{****} Se incubaron con actina según el procedimiento descrito en “materiales y métodos”

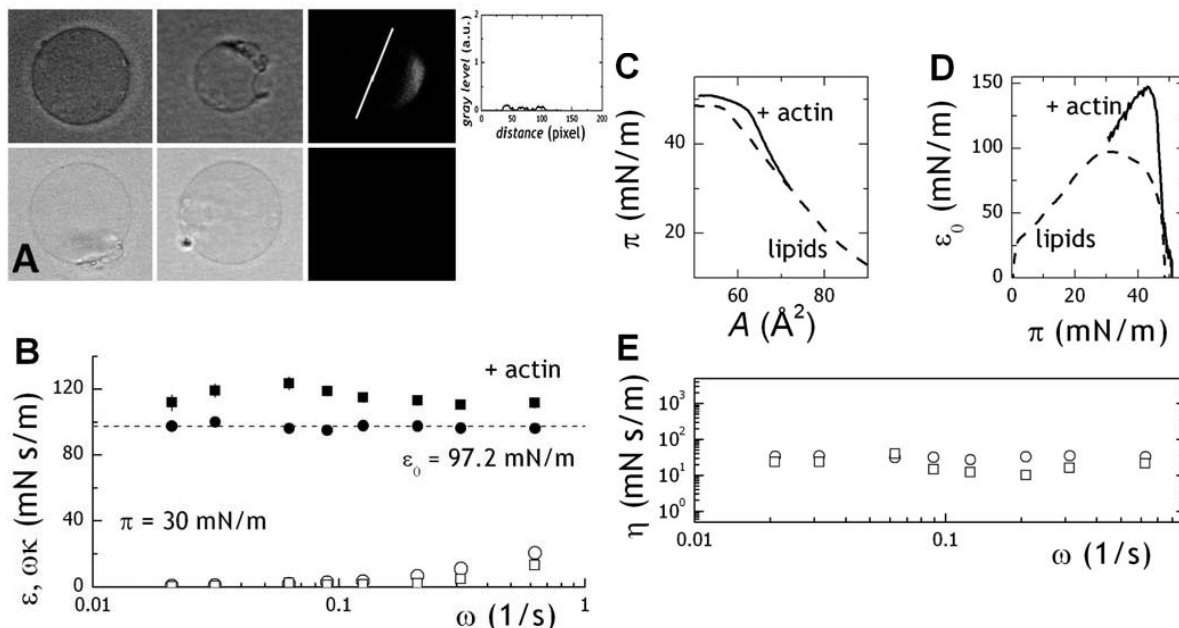


Figura 5.1-6 Interacción electrostática (80% POPC + 20% DODA). (A) En el panel superior se observan las imágenes por microscopía de contraste de fases y fluorescencia de GUVs compuestas de 80% POPC + 20% DODA (imagen de la izquierda es sólo composición de lípidos; imagen central es la mezcla lipídica con actina en campo claro y la derecha la misma pero en el campo fluorescente). La gráfica de la derecha es el perfil de intensidad de la GUV en el campo fluorescente. En el panel inferior es el control para la no-adsorción de actina en GUVs sólo de POPC. (B) Medida del módulo dinámico de elasticidad ($\epsilon'(\omega)$ con símbolos rellenos) y la pérdida de viscosidad ($\omega\kappa(\omega)$: símbolos huecos) medidos en función de la frecuencia (ω) en experimentos con barrera oscilatoria con monocapas de POPC + DODA (80:20): (●) en ausencia de F-actina; (■) en presencia de actina ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La línea punteada horizontal corresponde al módulo de compresión de equilibrio (ϵ_0). (C) Isotherma de compresión de las monocapas de POPC + DODA (80:20) comparadas antes (---) y después (—) de la unión con F-actina. (D) Módulo de compresión de equilibrio obtenido mediante los datos de (C). (E) Viscosidad dinámica de compresión, $\kappa(\omega)$, calculada a partir del módulo de pérdidas en (B); los símbolos siguen la misma estructura que en (B).

Una vez observada la posible interacción electrostática entre la proteína y la monolapa de lípidos cargada positivamente, se realizaron experimentos típicos de monocapas de Langmuir, con la misma composición, para evaluar el impacto mecánico de esta interacción^{††††}. Para el caso de la monolapa sin proteína, se observó un comportamiento Newtoniano típico de lípidos fluidos. En la figura 5-4B se muestra el valor del módulo dinámico de compresión que concuerda con el valor de equilibrio, $\epsilon(\omega) \approx \epsilon_0 \approx 97 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (figura 5.1-6 D). La pérdida del módulo resulta ser mucho más baja y débil mientras aumenta la frecuencia, $\omega\kappa \approx \omega^1$, lo esperado para fluidos Newtonianos con una viscosidad independiente del tiempo, $\kappa \approx \omega^0$ (figura 5.1-6 E). Por lo tanto, la relajación no viscoelástica está presente en la monolapa de lípido en el rango dinámico considerado, lo que corresponde a una membrana incompresible no muy afectada por los movimientos laterales difusivos lentos. Por otro lado, la elasticidad dinámica puede tomar valores por debajo del valor de equilibrio, $\epsilon(\omega) < \epsilon_0 = -A(\delta\pi/\delta A)_T$, y la pérdida del módulo puede estar afectada por una disipación difusiva, pero, en este caso, la difusión lateral

^{††††} Ver el apartado 3.4. Preparación de monocapas.

no tiene tiempo de operar haciendo que la deformación lateral provoque un estrés dilatacional equivalente al cambio de presión de equilibrio, $\epsilon(\omega) \approx \epsilon_0$, y el retraso viscoso se debe exclusivamente a la viscosidad intrínseca independiente del tiempo, $\kappa(\omega) \approx \kappa_0$. Esta es la conducta de compresión típica para membranas lipídicas fluidas a escalas de tiempo grandes.

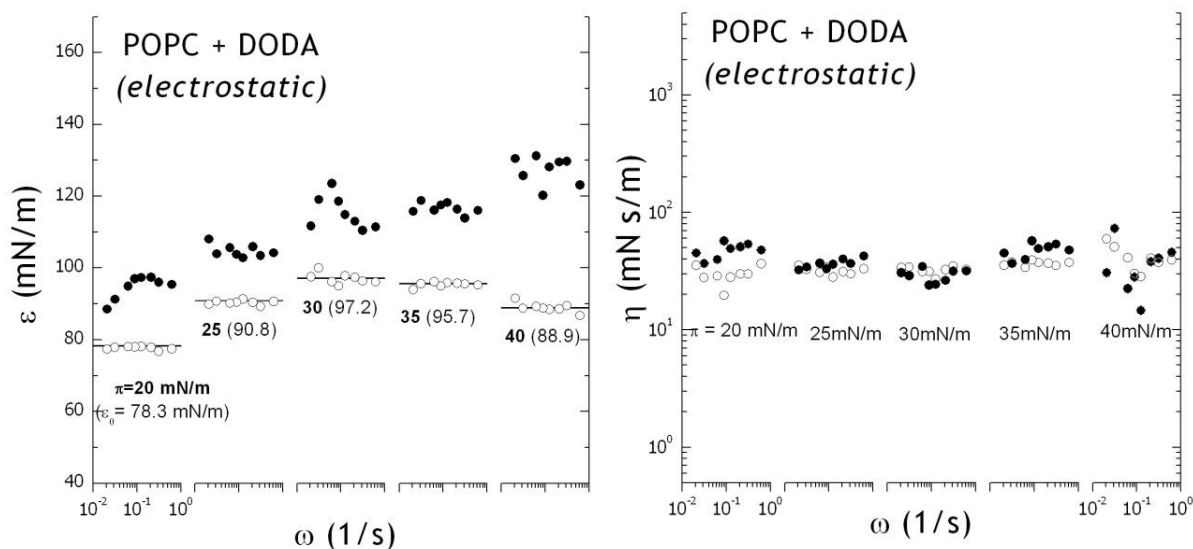


Figura 5.1-7. Unión electrostática: condiciones de deslizamiento *Izquierda:* módulo dinámico de elasticidad, $\epsilon(\omega)$, medido en función de la frecuencia de deformación (ω) en los experimentos de oscilación de barrera con monocapas formadas por POPC + DODA (80:20): (o) en ausencia de F-actina; (●) en presencia de F-actina (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los distintos escalones corresponden a las distintas presiones superficiales de la monocapa de lípidos (π ; los valores están representados con los números en negrita). La línea horizontal corresponde al valor del módulo de compresión de equilibrio medido a cada presión (ϵ_0 ; números expresados entre paréntesis). *Derecha:* viscosidad dinámica de compresión, $\eta(\omega)$ (los símbolos son los mismos que en la figura de la derecha).

En presencia de F-actina, el módulo de compresión aumenta debido a que los filamentos rígidos de actina comienzan a anclarse a la capa lipídica (figura 5.1-6 B). Este refuerzo inducido por actina se observa en todo el rango de presiones estudiado (Figura 5.1-7). El caso más relevante, 30 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, aumenta un 15% respecto al valor de la monocapa sin proteína (figura 5.1-6 B), sin embargo, el aumento de refuerzo se observa al aumentar la presión. La unión de actina se espera que aumente con un aumento de densidad de carga superficial de la monocapa. En un contexto de equilibrio, un aumento de rigidez de la membrana se debe a la compactación estructural, y sobre esta idea, la isoterma de compresión del complejo actina-lípidos fue medido a valores de compresión lenta (5 $\text{cm}^2\cdot\text{min}^{-1}$). En la figura 5.1-6 C se muestra que, a presiones alrededor de 30 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, la isoterma se encuentra a mayores presiones y con una mayor pendiente que la medida en ausencia de proteína, compatible con un empaquetamiento compacto. En la figura 5.1-6 D se muestran los valores del módulo de compresión de equilibrio calculado como la derivada numérica de la isoterma de compresión $\epsilon_0 = -A (\delta\pi / \delta A)T$. El elevado módulo de equilibrio está calculado para un sistema que contiene actina más que para un sistema sólo con la capa de lípidos, lo que corresponde a un empaquetamiento compacto inducido por la condensación electrostática. Como consecuencia, el incremento de la unión de

la proteína puede resultar en una disminución de la repulsión lateral debido a la compactación lateral lipídica.

Se observa una débil disminución de la viscosidad intrínseca Newtoniana (figura 5.1-6 E) al unirse con la actina (figura 5.1-6 B). De hecho, la interacción electrostática no mantiene la unión permanente sino que, la dilatación lateral de la capa de lípidos puede ser algo ineficaz al hacer fluir la proteína bajo la misma reorganizando el deslizamiento. Sin embargo, cuando la capa de lípidos con proteína se comprime reacciona con mayor rigidez respecto a la capa de lípidos desprovista de proteína, aunque la viscosidad superficial se mantiene sin cambios (Figura 5.1-7).

Para asegurarnos que la interacción electrostática se debía al lípido catiónico DODA y asegurarnos que la medida de la presión superficial se realizaba una vez se había inyectado la proteína en la subfase, se realizaron isotermas o experimentos control. Siguiendo el mismo protocolo de los experimentos realizados, se inyectó una disolución de G-actina concentrada ($c_p = 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) en la balanza de Langmuir, la cual contiene la disolución tamponada de polimerización (*F-buffer*) y la presión superficial se monitorizó con el tiempo hasta que llegó al equilibrio. En la interfase aire/líquido, en ausencia de lípido Figura 5.1-8, el proceso de adsorción sigue una cinética de dos etapas caracterizada por una rápida adsorción tras 5-10 minutos como un *pseudo-plateau*, $\pi_p^0 \approx 10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, seguida por un suave aumento hasta un valor de saturación de $18 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. Tras 90 minutos no se observó ningún cambio en la presión superficial, lo que sugirió que la proteína se encontraba en un estado totalmente desnaturizado caracterizado por la presión de esparcimiento, $\pi_{spr} \approx 18 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. Este proceso de adsorción – desnaturización ha sido descrito en condiciones similares por Renaoult *et al.* (1) y Demé *et al.* (2). Estos autores identificaron el valor de plató intermedio a una presión $\pi_p \approx 10 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ como característica del estado de adsorción de la F-actina polimerizada *in situ*, la cual se desnaturiza si está expuesta al aire, como se ha observado en las medidas reológicas.

Cuando se produce la adsorción bajo la monocapa lipídica, la cinética del proceso está caracterizada sólo por una única etapa de adsorción, sugiriendo que no se produce la desnaturización de la proteína, siendo coherente con estudios realizados previamente (1; 2; 13). La monocapa compuesta por lípido y proteína, se caracteriza por tener una mayor presión superficial que la bicapa lipídica sola, siendo el aumento de presión el correspondiente a la adsorción espontánea de la actina ($\Delta\pi = \pi_p - \pi_l$).

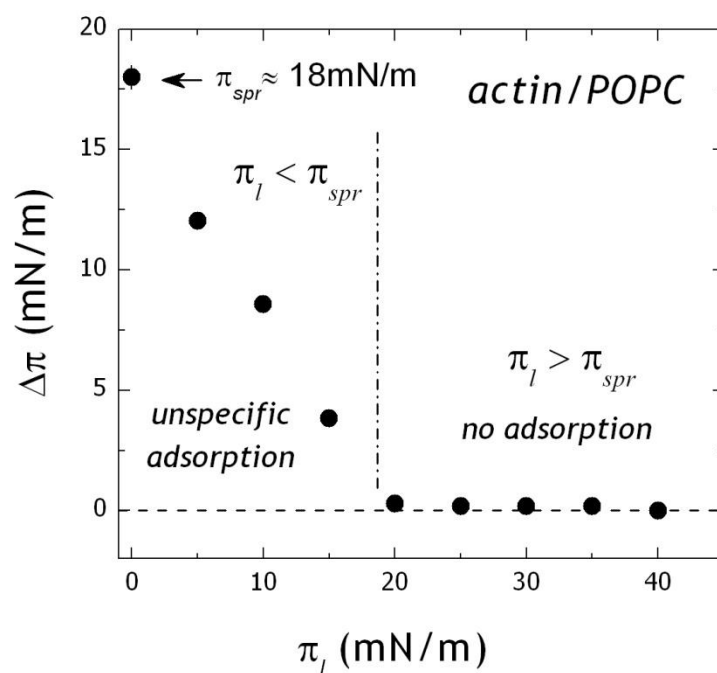


Figura 5.1-8: Aumento de la presión superficial ($\Delta\pi$) debido a la adsorción de la F-actina en la monocapa de POPC con una presión inicial π_l . El valor numérico de la presión superficial se puede interpretar como el aumento en la energía superficial debido a la adsorción de la proteína. La adsorción inespecífica ($\Delta\pi > 0$) sólo ocurre a presiones superficiales inferiores a la presión de esparcimiento de la actina ($\pi_l < \pi_{spr} \approx 18 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, línea de puntos verticales). La no adsorción de la proteína se detecta a altos empaquetamientos lipídicos ($\Delta\pi \approx 0$ a $\pi_l > \pi_{spr}$).

En la Figura 5.1-8 se muestra este valor de presión superficial medido tras la inyección de 50 μL de actina en la subfase (la concentración final de proteína $c_p = 1.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) a distintos estados caracterizados por el valor constante de π_l (presión inicial de la monocapa de lípido). Demé et al. (2) obtuvieron resultados similares para un sistema homólogo de DMPC/actina. Igualmente, la presión de esparcimiento de F-actina ($\pi_{spr} \approx 18 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) define dos regímenes de presión: 1) $\pi < \pi_{spr}$: donde la F-actina se encuentra co-adsorbida con el lípido provocando una disminución adicional de la energía superficial, y el aumento de presión disminuye progresivamente a medida que se aproxima la presión de esparcimiento. 2) $\pi > \pi_{spr}$: debido a que la presión inicial de la monocapa de lípido es mayor a la presión de esparcimiento de la proteína no hay ninguna razón energética para que la proteína se adsorba, y esto no produce ningún aumento en la presión superficial ($\Delta\pi \approx 0$). La presión de esparcimiento de la proteína define la transición entre dos regímenes; uno a valores de presión muy por encima de π_{spr} , donde predominan los efectos de la unión específica, mientras que por debajo de π_{spr} dominan los efectos inespecíficos.

5.3.1.2. Unión covalente.

La interacción adicional covalente se facilitó mediante la adición de un lípido con un grupo funcional succinimida que actúa como punto de anclaje a la membrana, con una composición de lípidos 70% POPC, 20% DODA y 10% Lip-NHS. La capacidad de unión fue comprobada mediante el control experimental con 80% POPC y 20% Lip-NHS. En este caso, se encontró una gran cantidad de proteína fluorescente distribuida homogéneamente en la membrana (Figura 5.1-9), sin embargo, se observaron muchas vesículas con grandes cambios como curvaturas negativas (las más comunes son estrangulamiento o “blebbing”), lo que sugiere una fuerte interacción topológica entre la membrana y la actina anclada covalentemente con una alta densidad de inserción (Figura 5.1-9 A). A diferencia del marco electrostático, la presencia de puntos de anclaje covalentes puede permitir un pegado permanente de F-actina, sin embargo, la interacción electrostática puede favorecer cinéticamente la migración de la proteína con la membrana en el proceso de unión. Como una referencia a los ensayos de unión, se observó una fuerte incorporación de actina cuando se incluía DODA en la composición lipídica (Figura 5.1-9A). En ese caso, la actina se acumula en la membrana como se puede ver en el perfil de intensidad (Figura 5.1-9), revelando una mayor eficacia en la estrategia de unión mediante interacción covalente + electrostática.

Del mismo modo que en el caso electrostático, se realizaron experimentos de reología de compresión en monocapas de Langmuir basado en el anclaje covalente + electrostático (70% POPC, 20% DODA y 10% Lip-NHS). En la Figura 5.1-9 B muestra la medida del módulo viscoelástico para la presión inicial de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (el resto de resultados a distintas presiones, se observa en la Figura 5.1-11). En ausencia de proteína, el módulo de compresión muestra una fuerte dependencia con el tiempo, al contrario de lo que se observaba en el marco electrostático puro (figura 5.1-6 B). La influencia dinámica del lipopolímero PEG es evidente en el rango de presiones donde $\epsilon \gg \epsilon_0$ (Figura 5.1-11).

Se han obtenido resultados similares en monocapas de Langmuir con un homólogo del lipopolímero con una mitad idéntica de 2 kDa de PEG (5; 12). A mayores presiones que el valor de Plateau ($\pi_p \approx 10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), la reología observada se asignó a un régimen de tipo “cepillo” donde, bajo la compresión lateral, las cadenas entrecruzadas de PEG están en una configuración más estirada. Al inyectar la proteína bajo la monocapa inicia la polimerización en la superficie y los filamentos de F-actina empiezan a anclarse covalentemente a la monocapa a través del anclaje con el lip-PEG-NHS Figura 5.1-9A). En este estado tipo bicapa ($\pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$), el pegado covalente induce a una mayor rigidez ($\epsilon_{\text{prot}} - \epsilon_{\text{lip}} \approx 40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) comparada con el marco electrostático donde $\epsilon_{\text{prot}} - \epsilon_{\text{lip}} \approx 15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Este efecto se obtiene de manera sistemática en otras presiones estudiadas (ver Figura 5.1-11). Se observa una relajación mecánica similar a la monocapa desprovista de lípido.

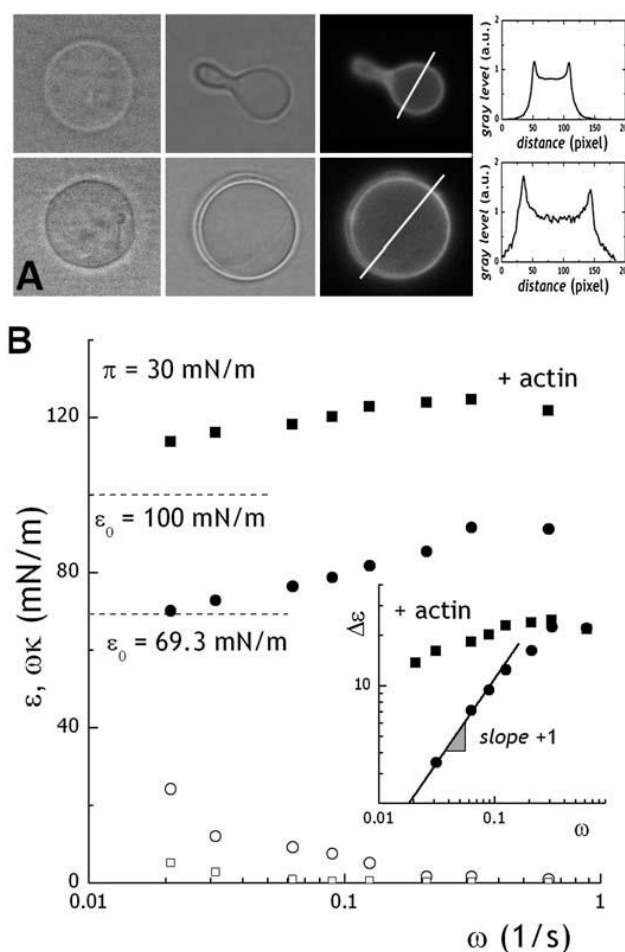


Figura 5.1-9 Unión covalente POPC, DODA y Lip-NHS. (A) Panel superior: imágenes de microscopía óptica de contraste de fases en campo claro y fluorescencia para una mezcla de POPC + Lip-NHS (80:20) (izquierda: sólo mezcla lipídica; centro: lípidos incubados con actina; derecha: la misma figura que centro pero en el canal fluorescente). Los perfiles de intensidad de fluorescencia están en la cuarta columna. Panel inferior: sistema compuesto por POPC + DODA + Lip-NHS (70:20:10). (B) Módulo dinámico de elasticidad ($\epsilon'(\omega)$: símbolos rellenos) y la pérdida de viscosidad ($\omega\kappa$ (ω): símbolos huecos) medidos en función de la frecuencia (ω) en experimentos con barrera oscilatoria con monocapas de POPC + DODA + Lip-NHS (70:20:10): (●) en ausencia de F-actina; (■) en presencia de actina ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La línea punteada horizontal corresponde al módulo de compresión de equilibrio (ϵ_0). Figura insertada: representación de la fuerza de relajación calculada como la diferencia del módulo dinámico y el valor de equilibrio ($\Delta\epsilon = \epsilon'(\omega) - \epsilon_0$, obtenido a partir de (B)). La línea con pendiente +1 representa un incremento tipo Maxwell.

La Figura 5.1-9 B muestra una evidencia adicional de la relajación viscoelástica en la pérdida de viscosidad. La existencia de una cadena entrelazándose al nivel de las cadenas de PEG parece aportar un carácter altamente viscoso a la monocapa desprovista de lipopolímero ($\omega\kappa \approx 30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, a las bajas frecuencias estudiadas, Figura 5.1-9 B). Para la monocapa desprovista de lipopolímero, el módulo de elasticidad aumenta linealmente con la frecuencia ($\epsilon' \sim \omega$, ver la figura insertada de Figura 5.1-9), en cambio, la pérdida de viscosidad ($\omega\kappa$) disminuye con ω^{-1} . Esto es compatible con una relajación tipo Maxwell, típica para una estructura tipo gel a frecuencias más altas que la inversa de su tiempo de relajación.

Cuando la actina está presente, se detecta una débil relajación elástica a presiones moderadas ($\pi \leq 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, figura insertada en Figura 5.1-9), pero se renormaliza a presiones altas ($\epsilon \approx \omega^1$ a $\pi > 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). En la figura 5.1-10 A se muestran los valores absolutos de viscosidad de compresión a $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La dependencia de la frecuencia con la viscosidad de compresión se caracteriza por un decrecimiento tipo Maxwell ($\kappa \approx \omega^{-2}$), indicativo de un carácter tipo gel de una monocapa de polímero, (14; 15) y compatible con el incremento lineal del módulo de elasticidad (figura insertada en Figura 5.1-9).

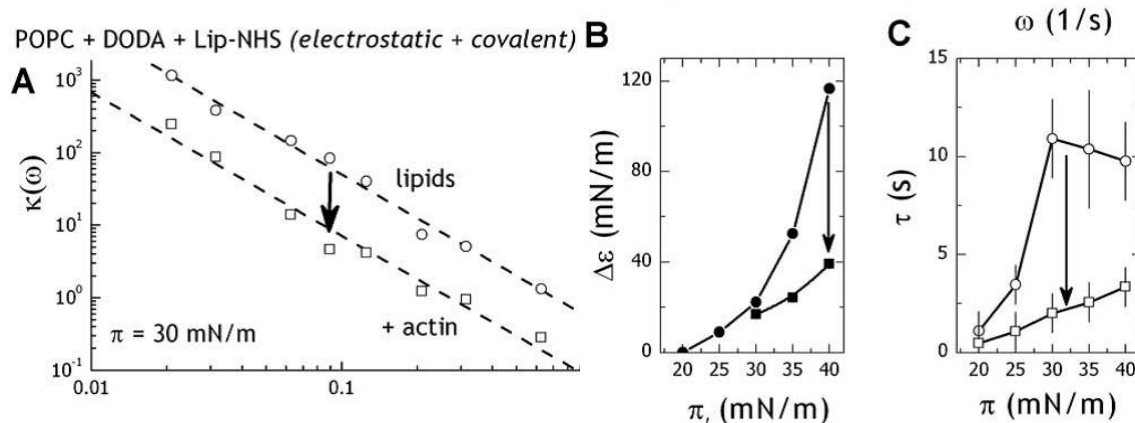


Figura 5.1-10 (A) Viscosidad de compresión dinámica, $\kappa(\omega)$, medida en función de la frecuencia de deformación en experimentos de barrera oscilatoria en monocapas compuestas de POPC + DODA + Lip-NHS (70:20:10): (O) en ausencia de F-actina; (\square) en presencia de F-actina ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). (B) Estimación de la fuerza de relajación, siguiendo la misma leyenda que (A). (C) Tiempos de relajación de compresión.

Sin embargo, las viscosidades muestran una disminución no trivial sobre el enlace covalente de F-actina. Para poder llevar a cabo el análisis cuantitativo de los tiempos de relajación se consideró una relajación tipo Maxwell. A frecuencias mayores que la inversa del tiempo característico ($\omega\tau > 1$) el sistema no tiene tiempo a relajarse, por lo tanto el elemento Maxwell almacena una energía elástica mayor que el módulo de equilibrio $\epsilon(\omega) \approx \epsilon_0 + \Delta\epsilon$ y se disipa débilmente con la viscosidad $\kappa(\omega) \approx \Delta\epsilon/\omega^2\eta$. Como consecuencia, los tiempos de relajación se pueden estimar como $\tau \approx \Delta\epsilon/\omega^2\eta$ ^{***}.

En la figura 5.1-10 B se muestra la gráfica de los valores de la fuerza de relajación estimada a distintos estados de presión. Según lo esperado, la capa de lípido, sin proteína, muestra una mayor relajación pero se observa una reducción significativa en presencia de proteína. Este efecto puede interpretarse como una consecuencia de la incrustación de elementos rígidos (filamentos de F-actina) en una estructura flexible tipo gel. En la figura 5.1-10 C muestra los tiempos de relajación efectivos, $\tau \approx \Delta\epsilon/\omega^2\eta$, que se calcularon como media de las cinco frecuencias más altas que se han estudiado ($\omega > 0.1 \text{ Hz}$). Los tiempos máximos de relajación, $\tau_{\text{máx}} = 10 \text{ s}$, corresponden a la baja relajación de los restos de PEG que se superponen en una

^{***} Las amplitudes de relajación pueden estimarse como la máxima diferencia entre el módulo dinámico medido a la mayor frecuencia y el valor de equilibrio ($\Delta\epsilon = \epsilon(\omega_{\text{máx}}) - \epsilon_0$) (el último calculado de las isothermas de compresión).

estructura tipo gel. Sin embargo, la F-actina produce una fluidificación con menor eficacia cuyos tiempos calculados son de ($\tau_{\text{prot}} \approx 1\text{-}3$ s).

La viscoelasticidad observada sugiere que para poder obtener una fluidificación efectiva de la membrana, es necesaria la interacción covalente con la F-actina. La dinámica resultante (una rápida relajación y un incremento de la fluidez) pueden deberse a los movimientos dirigidos de la actina activa que induce una relajación rápida en las cadenas de PEG.

5.3.2. Viscoelasticidad de cizalla: fluidificación activa.

Para verificar el efecto de la actividad de la membrana se realizaron unos estudios complementarios de la reología de cizalla en las monocapas de lípido ancladas con proteína. Los experimentos se realizaron en el modo oscilatorio a baja deformación de cizalla ($\gamma = 1\%$) donde se observó una respuesta lineal.

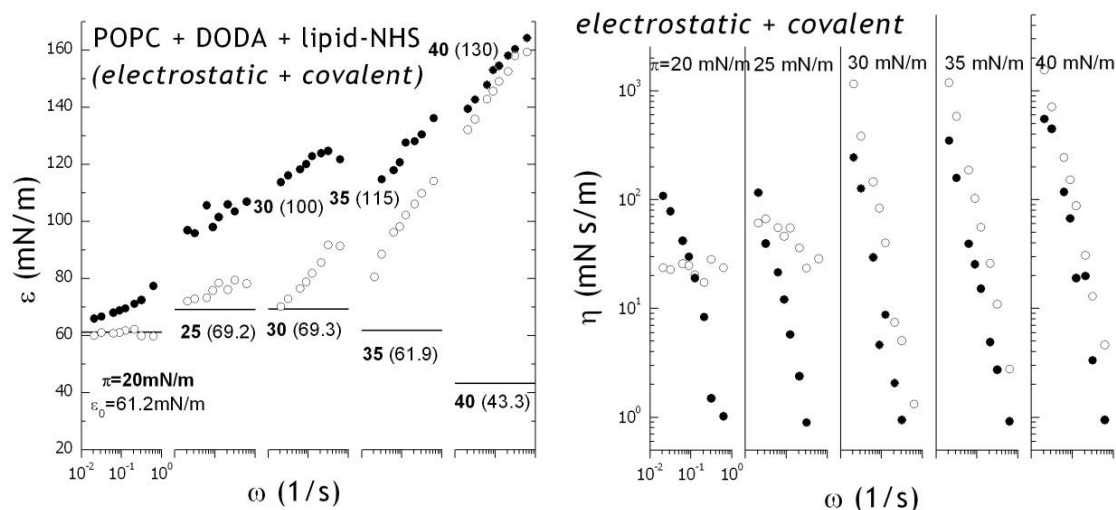


Figura 5.1-11 *Izquierda*: módulo dinámico de elasticidad, $\epsilon(\omega)$, medido en función de la frecuencia de deformación (ω) en los experimentos de oscilación de barrera con monocapas formadas por POPC + DODA + Lip-NHS (70:20:10): (O) en ausencia de F-actina; (●) en presencia de F-actina ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los distintos escalones corresponden a las distintas presiones superficiales de la monocapa de lípidos (π ; los valores están representados con los números en negrita). La línea horizontal corresponde al valor del módulo de compresión de equilibrio medido a cada presión (ϵ_0 ; números expresados entre paréntesis). *Derecha*: viscosidad dinámica de compresión, $\eta(\omega)$ (los símbolos son los mismos que en la figura de la derecha).

El módulo viscoelástico de cizalla, $G(c_p) = (G' + iG'')$, se monitorizó en función de la concentración de actina que variaba en sucesivas adiciones de alícuotas ($1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) bajo la monocapa de lípido ($\pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) esparcida en el F-buffer (100 mL).

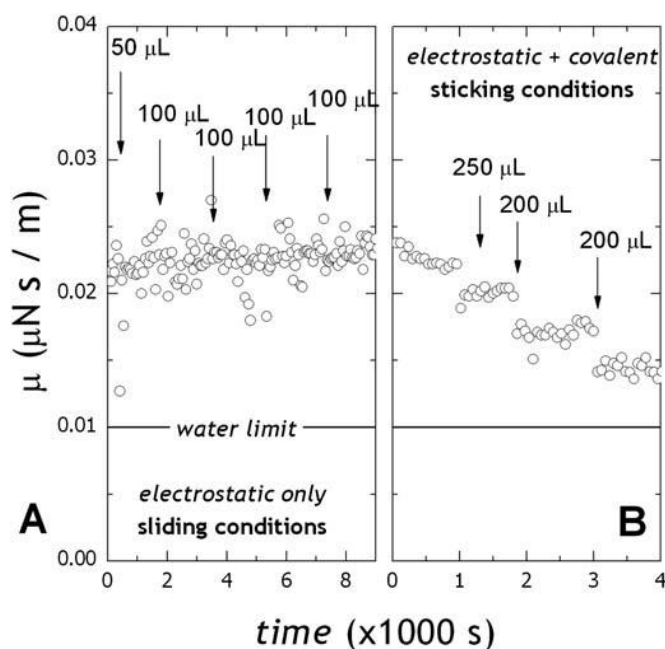


Figura 5.1-12. (A) Efecto de la unión de la F-actina al la viscosidad de cizalla superficial en monocapas de POPC con: (A) un 20% del lípido catiónico DODA, (B) con el 20% de DODA y un 10% del lípido PEG funcionalizado (Lip-NHS). Cada flecha indica los volúmenes de las alícuotas que se van inyectando en función del tiempo (1 mg·mL⁻¹). La concentración final de proteína es de 1 μg·mL⁻¹ por cada 100 μg. La evolución temporal en (B) (electrostático + covalente) muestra una fluidificación activa de la monocapa hacia una mayor fluidificación correspondiente a la interfase desnuda (sin capa orgánica).

En el rango de concentración diluida ($c_p \leq 5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), no se detectó ninguna resistencia a la cizalla ($G' \approx 0$) ni en la monocapa de lípidos, ni al inyectar las alícuotas de actina en presencia de ATP. [20,21]. Las viscosidades de cizalla (μ) se muestran en la gráfica de la Figura 5.1-12. Las capas de lípidos se caracterizan por tener una viscosidad muy baja, $\mu \approx 0.021 \mu\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ para POPC + DODA (Figura 5.1-12 A) y algo mayor cuando se incluye el punto de anclaje covalente $\mu \approx 0.025 \mu\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ (Figura 5.1-12 B). Estos valores indican que tienen una gran fluidez, típica para lípidos fluidos de monocapas. Se estudió la evolución con el tiempo de la variación de la viscosidad Figura 5.1-12 (cada 10-15 min. se hacía una nueva inyección de proteína) y se observó que para el caso del marco electrostático (POPC + DODA) no se observaba ningún cambio durante las inyecciones sucesivas, sin embargo, en el marco covalente (POPC+DODA+líp-NHS) se observaba una disminución significativa de la viscosidad de cizalla de la monocapa en cada inyección de proteína (Figura 5.1-12 B).

5.3.3. Mecanismo molecular: ¿Movimiento de “treadmilling”?

La fluidificación observada no podría ser posible en un sistema de equilibrio “pasivo”, entendido como una estructura macromolecular en equilibrio térmico. Sin embargo, en un contexto “activo”, esto parece completamente normal si un *motor molecular* es capaz de mantener el funcionamiento fuera del equilibrio bajo la actividad de fosforilación o de hidrólisis de ATP. (16; 17; 18).

En este estudio *in vitro* se considera la F-actina en estado diluido ($c \ll 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (19; 20; 21) en presencia de un exceso de ATP (1 mM). La proteína se encuentra anclada a la membrana en una relación sub-estequiométrica (menor al 3% mol/mol de Lip-NHS), lo que conside-

ra que el córtex de actina está diluido e injertado a una densidad lo suficientemente baja como para sostener la velocidad de “treadmilling” en el mismo orden que en una disolución diluida. Sin embargo, en la 5.1-10, se observa una reducción de los tiempos de relajación de la membrana desde $\tau_{\text{PROT}} \approx 10$ s (característico de dinámicas lentas de la monocapa de lipopolímero) hasta $\tau_{\text{PROT}} \approx 2$ s cuando el córtex de actina está pegado. Esta dinámica rápida es compatible con la velocidad de polimerización aportada por Kueh *et al.* (22), sugiriendo que la dinámica activa observada corresponde a los movimientos de membrana no térmicos inducidos localmente por el “treadmilling” de los polímeros de actina, contribuyendo en una escala por debajo de la micra, correspondiendo, probablemente, a la distancia entre distintos puntos de anclaje.

5.4. CONCLUSIONES

Se han propuesto dos escenarios distintos para el anclaje de actina, uno puramente electrostático a través de lípidos catiónicos y otro electrostático combinado con el anclaje covalente a través del grupo funcional succinimida. En ambos casos, la unión a la membrana en la disolución tamponada de polimerización se observó mediante la microscopía de fluorescencia. Se realizó un estudio reológico con monocapas de Langmuir para ambos escenarios mediante ensayos mecánicos de compresión y cizalla. Cuando la concentración de proteína se encuentra por debajo del valor crítico de “filamento enmarañado”, la membrana sigue siendo fluida ($G' = 0$) independientemente de la naturaleza del elemento de anclaje. En los experimentos de compresión, se observa un refuerzo a la membrana cuando se encuentra unida a la actina, como se esperaba debido a la gran rigidez intrínseca de los filamentos. Sin embargo, la superficie de viscosidad se comporta diferente en cada tipo de anclaje. En el marco electrostático no se detectó ningún tipo de impacto, pero si se observó una disminución significativa cuando la actina se une covalentemente a la membrana. En el primer caso, los filamentos de actina son adsorbidos físicamente a la membrana, por lo que son capaces de deslizarse libremente bajo flujo. Para la unión covalente, los movimientos de actina aumentan el transporte de membrana dando como resultado una aparente mayor fluidez. Esto constituye una evidencia seminal de la “actividad de membrana” inducida *in vitro* mediante una unión con F-actina.

5.5. AGRADECIMIENTOS

Para terminar el capítulo me gustaría agradecer a las personas que me han ayudado a realizarlo. Agradecer al Dr. Paolo Natale por la realización del marcaje fluorescente de actina, a la Dra. Lara H. Moleiro y el Dr. Ruddi Rodríguez por enseñarme a realizar correctamente las muestras de vesículas y al Dr. Francisco Monroy por enseñarme y ayudarme en la realización de experimentos de reología de membranas con el apoyo de la Universidad de Paris Sud XI.

REFERENCIAS

1. *Apha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics.* **Kobielak, Agnieszka y Fuchs, Elaine.** 2004, Nature, Vol. 5, págs. 614-625.
2. *Cadherin-actin interactions at adherens junctions.* **Yonemura, Shigenobu.** 2011, Current Opinion in Cell Biology, Vol. 23, págs. 515-522.
3. *Monomeric alpha-catenin links cadherin to the actin cytoskeleton.* **Ridhdhi Desai, Ritu Sarpal, Noboru Ishiyama, Milena Pellikka, Mitsuhiro Ikura, Ulrich Tepass.** 3, 2013, Nature - Cell Biology, Vol. 15, págs. 261-275.
4. *Surface-Induced Polymerization of Actin.* **Anne Renault, Pierre-François Lenne, Cécile Zakri, Achod Aradian, Catherine Vénien-Bryan, François Amblard.** 1999, Biophysical Journal, Vol. 79, págs. 1580-1590.
5. *Binding of actin filaments to charged lipid monolayers: Film balance experiments combined with neutron reflectivity.* **B. Demé, D. Hess, M. Tristl, Lay-Theng Lee, E. Sackmann.** 2000, The European Physical Journal E, Vol. 2, págs. 125–136.
6. *Rheology of two-dimensional F-actin networks associated with a lipid interface.* **Robert Walder, Alex J. Levine, Michael Dennin.** 2008, Vol. 77, págs. 011909.
7. *Reconstitution of an actin cortex inside a liposome.* . **L. Pontani, J. van der Gucht, G. Salbreux, J. Heuvingh, J.-F. Joanny, C. Sykes.** 2009, Biophys. J., Vol. 96, págs. 192.
8. *High-Pressure Transition of a Poly(ethylene glycol)-Grafted Phospholipid Monolayer at the Air/Water Interface.* **V. Tsukanova, C. Salesse.** 19, 2003, Macromolecules, Vol. 36, págs. 7227–7235.
9. *Viscoelastic Properties of Lipopolymers at the Air–Water Interface: A Combined Interfacial Stress Rheometer and Film Balance Study.* **C.A. Nauman, C. F. Brooks, G.G. Fuller, W. Knoll, C. W. Frank.** 22, 1999, Langmuir, Vol. 15, págs. 7752-7761.
10. *Rheological Properties of Lipopolymer-Phospholipid Mixtures at the Air-Water Interface: A Novel Form of Two-dimensional Physical Gelation.* **C. A. Nauman, C.F. Brooks, G.G. Fuller.** 9, 2001, Macromolecules, Vol. 34, págs. 3024-3032.
11. *Lipid domains in giant unilamellar vesicles and their correspondence with equilibrium thermodynamic phases: A quantitative fluorescence microscopy imaging approach.* **M.Fidora, A. Garcia, J. Ipsen, S. Hartel, L.A. Bagatolli.** 10, 2009, BBA- Biomembranes, Vol. 1788, págs. 2142–2149.
12. *Components of the lateral pressure in lipid bilayers deduced from HII phase dimensions.* **Marsh, Derek.** 2, 1996, BBA- Biomembranes, Vol. 1286.
13. *High Fluidity and Soft Elasticity of the Inner Membrane of Escherichia coli Revealed by the Surface Rheology of Model Langmuir Monolayers.* **Iván López-Montero, Laura R. Arriaga, Francisco Monory, Germán Rivas, Pedro Tarazona, Marisela Vélez.** 2008, Langmuir, Vol. 24, págs. 4065-4076.

14. *Dilatational rheology of insoluble polymer monolayers: Poly(vinylacetate)*. **F. Monroy, F. Ortega, R.G. Rubio**. 1998, *Physical Review E*, Vol. 58, pág. 629.
15. *Interfacial rheology of polyelectrolytes and polymer monolayers at the air–water interface*. **D. Langevin, F. Monroy**. 2010, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Vol. 15, págs. 283–293.
16. *Actin binding to lipid-inserted α -actinin*. **M. Fritz, R. M. Zimmermann, M. Bärmann, H. E. Gaub**. 1993, *Biophysical Journal*, Vol. 65, págs. 1878–1885.
17. *Viscoelastic moduli of sterically and chemically cross-linked actin networks in the dilute to semidilute regime: measurements by oscillating disk rheometer*. **O. Mueller, H. E. Gaub, M. Baermann, E. Sackmann**. 1991, *Macromolecules*, Vol. 24, págs. 3111–3120.
18. **Ferry, J.** *Viscoelastic Properties of Polymers*. s.l. : John Wiley & Sons Inc., 1980.
19. **Gennes, P. G. de.** *Scaling Concepts in Polymer Physics*. London : Cornell University Press, 1979.
20. *The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals*. **C. Revenu, R. Athman, S. Robine, D. Louvard**. 2004, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Vol. 4, pág. 365.
21. *Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments*. **Pollard, T. D.** 1986, *J. Cell Biol.*, Vol. 103, pág. 2747.
22. *A Correlative Analysis of Actin Filament Assembly, Structure, and Dynamics*. **M. O. Steinmetz, K. N. Goldie, U. Aebi**. 1997, *J. Cell Biol.*, Vol. 138, pág. 559.
23. *Elasticity of semiflexible biopolymer networks*. **F. C. Mackintosh, J. Kas, P. A. Janmey**. 1995, *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 75, pág. 4425.
24. *Scaling of F-actin network rheology to probe single filament elasticity and dynamics*. **J. H. Shin, M. L. Gardel, L. Mahadevan, P. Matsudaira, D. A. Weitz**. 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 101, pág. 9636.
25. *Structure of Actin Cross-Linked with α -Actinin: A Network of Bundles*. **O. Pelletier, E. Pokidysheva, L. S. Hirst, N. Buxsein, Y. Li, C. R. Safinya**. 2003, *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 91, pág. 148102.
26. *Dynamic stabilization of actin filaments*. **H. Y. Kueh, W. M. Brieher, T. J. Mitchison**. 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 105, pág. 16531.

CAPÍTULO 6:

EL GLÓBULO ROJO COMO

SISTEMA MODELO:

DIAGRAMA DE FASES Y MECÁNICA

En este capítulo se realiza el estudio de la membrana del glóbulo rojo mediante experimentos de reología (2D) como de reconstitución en sistemas modelo (3D), así como el diagrama de fases de los lípidos que constituyen la membrana interna del mismo.

Este capítulo está basado en el artículo:

Silvia Isanta, Isabel Uruburu, Iván López-Montero y Francisco Monroy. “Phase Diagram of Erythrocyte Inner Membrane” (En preparación)

6.1. INTRODUCCIÓN GLÓBULO ROJO

RELACIÓN CITOESQUELETO DE ACTINA CON GLÓBULO ROJO

La membrana del glóbulo rojo está compuesta por una bicapa lipídica y una red de citoesqueleto bajo la membrana. Esta red de citoesqueleto está compuesta principalmente por las proteínas: espectrina, actina y la proteína 4.1. La red de citoesqueleto se une a las proteínas integrales de membrana a través de proteínas de anclaje (1).

Mientras que en otros tipos celulares, como son los leucocitos, la red de citoesqueleto está formada principalmente por actina, en los eritrocitos la actina es una proteína minoritaria en la red de espectrina, pero no menos importante, presente en los complejos de unión del citoesqueleto^{§§§§}.

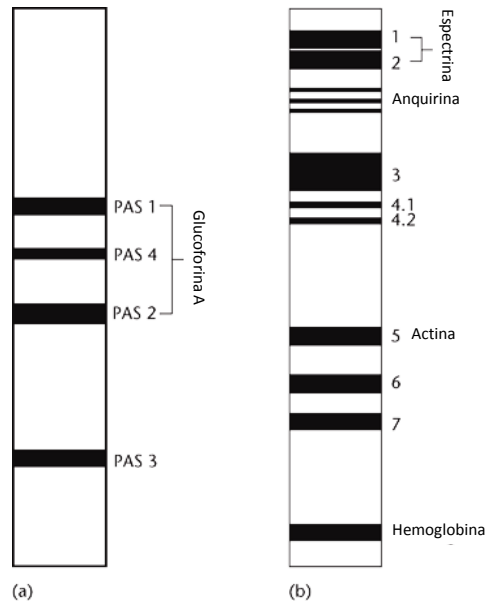


Figura 6.1-1: Imagen adaptada de (2). Gel de electroforesis de poliacrilamida de las proteínas asociadas a las membranas del eritrocito. Las proteínas integrales de membrana y las participantes en el citoesqueleto de membrana se clasifican por su movilidad electroforética en el gel de poliacrilamida. Tanto en a, como en b se muestran las bandas más características.

El papel más importante de la proteína 4.1 es en la unión espectrina, el filamento estructural de la red de citoesqueleto, con la bicapa lipídica al facilitar el complejo de unión de las fibras de espectrina – actina, el dominio citoplasmático de la banda 3, p55 y la glucoforina C. La polimerización de la actina tiene gran importancia funcional para proporcionar flexibilidad a la membrana del eritrocito, la cual aumenta si la polimerización de actina se inhibe, aunque también es cierto que si aumenta la polimerización hace que la membrana del glóbulo rojo se torne más rígida. Los dímeros de espectrina que se unen a los filamentos de actina cerca del extremo terminal de la molécula de espectrina. De media, seis terminales de espectrina forman el complejo con cada oligómero de actina, constituyendo una red hexagonal irregular.

^{§§§§} Para más detalle ver el capítulo de introducción.

INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA

Como se comentó en el capítulo de introducción, las membranas del **GLÓBULO ROJO** son ampliamente estudiadas como modelo de membrana debido a que son células que carecen de núcleo, por lo que es más fácil obtener más información de la membrana. (3)

Los eritrocitos, como toda célula, tienen la característica de tener asimetría de membrana, siendo distinta su composición en la membrana externa que en la interna, dependiendo de las funciones que se vayan a desempeñar, cambios en la asimetría pueden llegar a provocar enfermedades sanguíneas. (4; 5)

Los efectos que se producen sobre la estructura lipídica y las proteínas de la membrana se pueden describir en términos de interacciones moleculares entre las moléculas de lípido – proteína como el efecto hidrofóbico, uniones mediante enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas (5). También son importantes las interacciones lípido – lípido, como son la interacción entre PC y PE, que es conocido que son determinantes en la curvatura de la membrana. Estas fuerzas de flexión conducen a ciertas proteínas de membrana a localizarse en zonas determinadas con una curvatura local adecuada, que a su vez, también requieren de un entorno rico en lípidos con una curvatura espontánea adecuada. Por lo general, las proteínas tienen a unirse electrostáticamente a dominios ricos en lípidos cargados, por lo general PS, y en algunos casos, cationes divalentes como el calcio (Ca^{2+}), forman entes de unión entre las proteínas y las cabezas de los fosfolípidos.

Para poder estudiar la aproximación física al problema de la estabilidad de la membrana se requiere una descripción física de varios parámetros, como son la fluidez de membrana, tensión lateral, y elasticidad de membrana. Si se unen las explicaciones físicas y moleculares del problema, se obtiene una visión integral del complejo problema de la mecánica funcional de toda la membrana.

En este capítulo se pretende mostrar la clara evidencia experimental de la importancia que cada interacción lípido – proteína tiene en la estabilidad estructural de la bicapa lipídica y del componente proteico, como los requerimientos para una adecuada función en la membrana. Es por ello que nos hemos basado en el modelo de membrana del glóbulo rojo, sobretodo en su membrana interna, donde se localiza el citoesqueleto de membrana.

6.2. ABORDAJE EXPERIMENTAL

Para la realización de este trabajo vamos a abordar tres objetivos: el estudio reológico del extracto de eritrocito mediante la formación de monocapas de Langmuir y realizando experimentos de compresión-expansión; el estudio de la estabilidad de la membrana interna a partir de una mezcla individual de lípidos sintéticos, en el que estudiaremos cómo varía su estabilidad en función de la composición lipídica y observando los cambios en la fluidez de la membrana al variar la concentración del colesterol; y se realizará el estudio de la estabilidad

de la membrana interna al introducir una fracción de extracto de eritrocito, el cual contiene no sólo lípido sino también las proteínas de citoesqueleto.

6.2.1. Estudio reológico del extracto de membrana de eritrocito (EME)

Para el estudio reológico de la membrana de eritrocito se seguirá un procedimiento similar al empleado en el **capítulo 5** al estudiar las monocapas de lípidos en presencia de actina.

Para ello se realizará un estudio del comportamiento mecánico de una membrana modelo constituida por POPC, a la concentración de 0.5 mM, como sistema de referencia en los medios empleados como subfase que se emplearán para estudiar las monocapas de EME^{****}.

Se emplearon cuatro subfases distintas, todas ellas constituidas por una disolución tampón con 100 mM de cloruro de sodio, 40 mM de glucosa, 10 mM de Hepes, 5 mM de cloruro de magnesio y una concentración de ATP variable – 0, 1, 2 y 5 mM – a un pH fisiológico de 7.4. Todos los medios tamponados fueron preparados con agua mili-Q.

Las monocapas de lípido en la interfase aire-agua se realizaron en una balanza de Langmuir. Al depositar la disolución de POPC en cloroformo sobre la superficie acuosa se espera a la evaporación del disolvente orgánico para que se establezca la monocapa y poder realizar las medidas de las isothermas de compresión-expansión. Para realizar los experimentos en presencia del EME, se realiza el procedimiento anterior, y una vez se encuentra estabilizada la monocapa de POPC, se inyectan 20 μ L de extracto de membrana de eritrocito y se espera a la estabilización de la misma para poder realizar las medidas.

Estos estudios de las monocapas se realizaron en todas las disoluciones tamponadas en función de la velocidad y a presiones iniciales de POPC variables, prestando siempre mayor interés a las presiones similares a las condiciones fisiológicas.

6.2.2. Estudio del diagrama de fases de la membrana interna del eritrocito con lípido sintético

Para los experimentos con lípido sintético se ha tenido en cuenta la composición de la membrana interna. Los lípidos que se estudiaron fueron la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidilserina (PS) y la fosfatidiletanolamina (PE) ya que son éstos los máximos representantes de la capa interna. La proporción de esfingomielina es muy baja (un 4% aproximadamente) por lo que no la tuvimos en cuenta en estos estudios. Se tomarán los lípidos mayoritarios, más colesterol, y se prepararán vesículas unilamelares gigantes mediante la técnica de la electroformación observándose los resultados con microscopía óptica en contraste de fases y fluorescencia (6).

^{****} Para saber cómo se realizó la obtención del EME, véase el apartado 3.3 de la sección experimental.

Se realizaron los diagramas de fases cuaternarios en base a la composición teórica de lípidos mayoritarios en la membrana interna del eritrocito. Moviéndonos en distintas concentraciones o porcentajes de colesterol (0, 15, 30, 40, 50%) se fueron estudiando las distintas composiciones lipídicas. La técnica empleada para realizar las GUVs se describe en el apartado 2.5.2 del capítulo 3, sección experimental, con variación de la composición lipídica correspondiente, indicada más adelante, del diagrama de fases según la composición de colesterol. Todos los experimentos fueron realizados en presencia de Rh-PE para poder observar la fluorescencia en el canal de lípido.

6.2.3. Estudio del diagrama de fases de la membrana interna del eritrocito en presencia de EME

Para la realización de estos experimentos se tomó como base la composición de lípido de la membrana interna del eritrocito al 30% de colesterol, con un 20 % de EME.

Para la realización de los experimentos se siguió el protocolo:

1. Se prepara una mezcla de lípidos de concentración 25mM. De esa mezcla se extraen 10 μ L y se contienen en un recipiente transparente. Se evapora el disolvente mediante una bomba de vacío, hasta quedar un film de lípidos.
2. Una vez evaporado el disolvente de los lípidos se mezcla con 5 μ L de extracto de eritrocito a 10 mM, teniendo de este modo la concentración de lípidos de 50 mM (relación lípido/RBC 80:20). Cuando ya esta mezclado y arrancado el lípido pegado en la pared, se diluye con 15 μ L de agua.
3. Se prepara una placa para la electroformación de GUVs⁺⁺⁺⁺. En ella se prepara un rectángulo de 1,5x2,5 cm en el que se esparcirá en cada placa unos 7,5 μ L de mezcla lípido/RBC hasta que quede una capa seca que recubra todo el área enmarcada. Se cierra con una pasta de cera blanca, se echa sacarosa 200mM una vez está preparado para la electroformación.
4. La electroformación se realiza a un voltaje de 1.1V (reales) y a una frecuencia de 8Hz durante un mínimo de 2 horas.
5. Observación de la mezcla lipídica con extracto de RBC, en medio de glucosa, para poder observar el contraste de fases, y en medio tamponado. Se realizaron observaciones tanto en ausencia como en presencia de ATP.

⁺⁺⁺⁺ Variación del método de Montes *et al.* (10)

6.3. RESULTADOS

En esta sección de resultados se explicarán por separado los resultados obtenidos para los experimentos reológicos y para el diagrama de fases, tanto en ausencia como presencia de EME, y finalmente se realizará una discusión integradora de los resultados.

6.3.1. Citoesqueleto en monocapas de sistemas modelo RBC en 2D

Para el estudio de la reología en monocapas de Langmuir de la membrana de glóbulo rojo, se debe realizar un primero estudio de una monocapa modelo. En la presente tesis se escogió el estudio de monocapas modelo del POPC ya que es un lípido neutro con mucha bibliografía para tener estudios de referencia.

Para ello se realizaron isothermas de compresión a distintas velocidades para poder escoger la que mejor se ajustara a nuestras condiciones y poder obtener unos datos óptimos de los experimentos realizados en la balanza de Langmuir. Las isothermas de compresión se realizaron tanto en medio acuoso (agua mili-Q) como en las disoluciones tamponadas descritas en el epígrafe 6.2.1. Una vez encontradas las condiciones óptimas, se inyectaron 50 μL de extracto de membrana de glóbulo rojo bajo monocapa, llevándolo a distintas presiones iniciales para el POPC y realizar estudios de compresión.

Con las isothermas de compresión del POPC a distintas velocidades, lo que se observó fue que a la velocidad de 30 cm^2/min , se obtenían los resultados más definidos, lo cual indica que el sistema de estudiado tiene tiempo a organizarse para obtener unas condiciones óptimas. Es por ello que se decidió emplear esta velocidad para la realización de los experimentos posteriores.

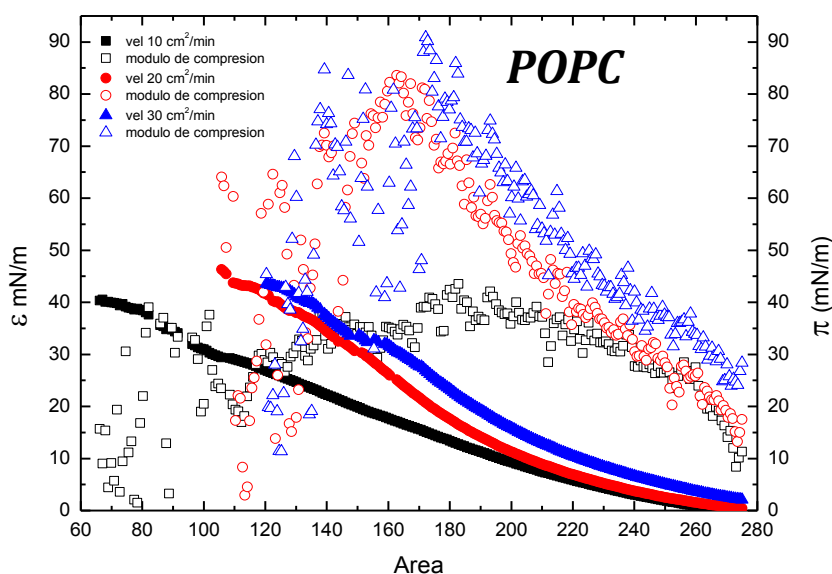


Figura 6.3-1 Variación del módulo elástico y presión en función de la velocidad de compresión de la monocapa de POPC.

La estabilización de las monocapas de POPC ocurre tras esperar 10 minutos típicamente. Al inyectar el extracto de membrana bajo la monocapa, éste se acopla a los espacios vacíos entre las moléculas de POPC que forman la monocapa y se reorganiza evitando que las proteínas presentes en el sistema se desnaturalicen (ver abajo).

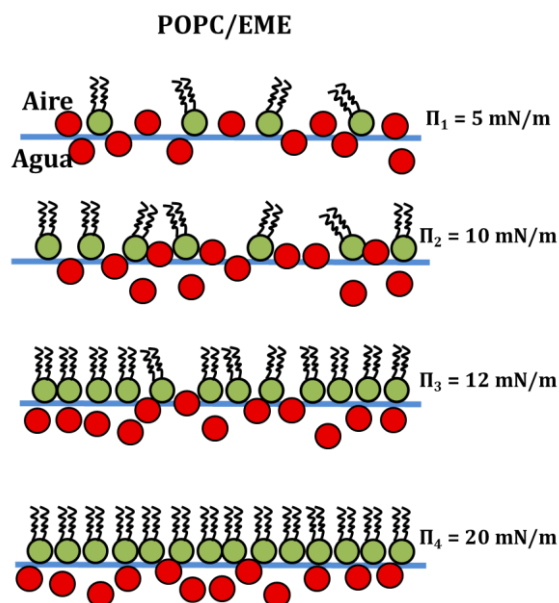


Figura 6.3-2: Dibujo esquemático de la reorganización del extracto de membrana al ser inyectado bajo la monocapa de lípidos para las distintas presiones iniciales empleadas en este estudio. (EME = ●)

Al realizar las isothermas de compresión a 24.5°C, se observó una disminución del módulo elástico de compresión respecto a los experimentos de isothermas con POPC, indicando un reblandecimiento de la monocapa, es más flexible.

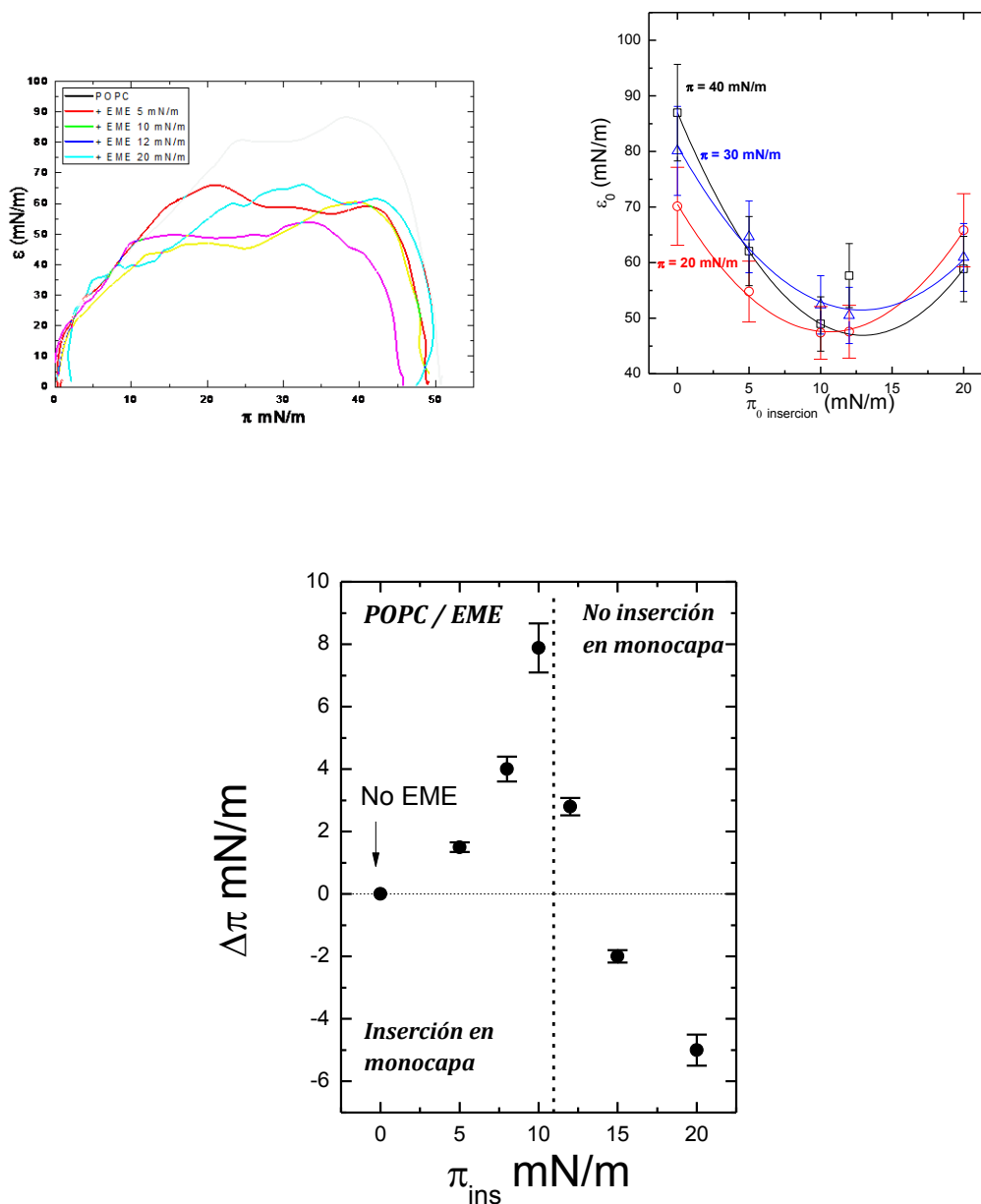


Figura 6.3-3: *arriba izquierda*, se muestra la representación de los valores obtenidos del módulo elástico de compresión en función de la presión de la monocapa, se observa una disminución del módulo a medida que aumenta la presión inicial de inyección del extracto de membrana bajo monocapa, salvo a $\pi = 20$ mN/m; *arriba derecha*, se observa la variación del módulo elástico de compresión en función de las presiones características de membrana, a estados de bajas presiones ($\pi = 20$ mN/m, en rojo), a presiones bajas ($\pi = 30$ mN/m en azul) y a altas presiones ($\pi = 40$ mN/m en negro); *abajo*, gráfica representativa de la variación de presión, respecto a la presión inicial de inserción del extracto en la monocapa, donde se observa un claro aumento hasta una presión de 10 mN/m a partir de la cual empieza a disminuir dicha variación, indicando una aproximación del grado de inserción del extracto de membrana a la monocapa de POPC.

A medida que se aumenta la presión inicial de la monocapa antes de inyectar el *EME*, el módulo de compresión disminuye hasta los 12 mN/m donde aumenta de nuevo (Figura 6.3-3). Esto significa que a partir de dicha π_0 el *EME* ya no se inserta en la monocapa, por lo que los parámetros mecánicos están dominados por las propiedades del POPC, en lugar del *EME*. Los valores del módulo disminuyen hasta los 12 mN/m, lo cual nos indica que el *EME* fluidifica la membrana. Es por ello que los experimentos que siguen se realizaron para presiones inferiores al 10 mN/m.

La clara fluidificación de la monocapa de Langmuir al insertarse el extracto de membrana en la misma nos guio a la realización de los experimentos en presencia de ATP 2 mM para observar la actividad del citoesqueleto bajo la monocapa. Se tomó la presión de 5 mN/m como presión de referencia al tener mayor margen entre la inserción del citoesqueleto y la no inserción del mismo. Se observó un claro cambio en el comportamiento de la isoterma de compresión como puede observarse en la Figura 6.3-4. El aumento de presión en presencia de ATP fue, aproximadamente, 7 veces mayor que en ausencia de ATP, indicando una clara actividad e influencia del citoesqueleto en la subfase.

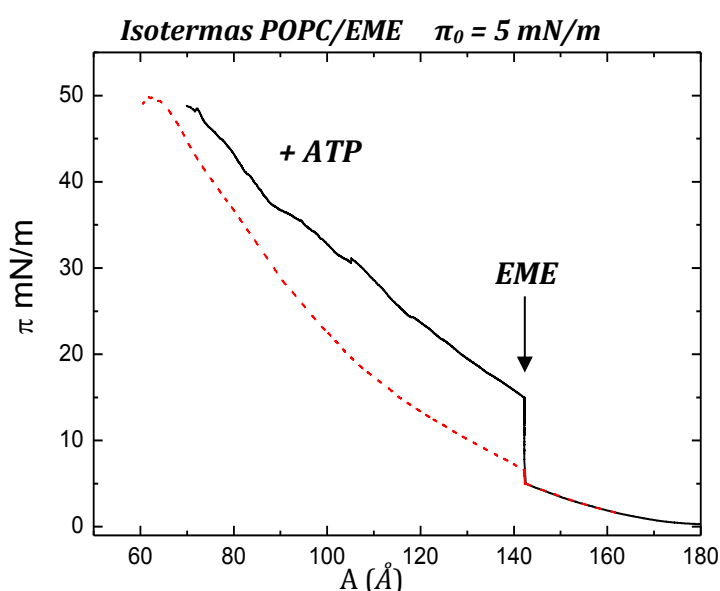


Figura 6.3-4: Variación de la presión en función del área en ausencia de ATP (línea roja discontinua) y en presencia de ATP (línea negra continua).

Observada dicha variación en la presión de 5 mN/m, se quiso realizar el estudio comparativo con las presiones iniciales de la monocapa anteriores. En todos los casos se observó una variación clara en las isothermas de compresión al inyectar bajo la monocapa el extracto de membrana de glóbulo rojo (Figura 6.3-5 A), del mismo modo que se observó una disminución del módulo elástico de compresión (Figura 6.3-5C) con un comportamiento similar a sin ATP (Figura 6.3-3).

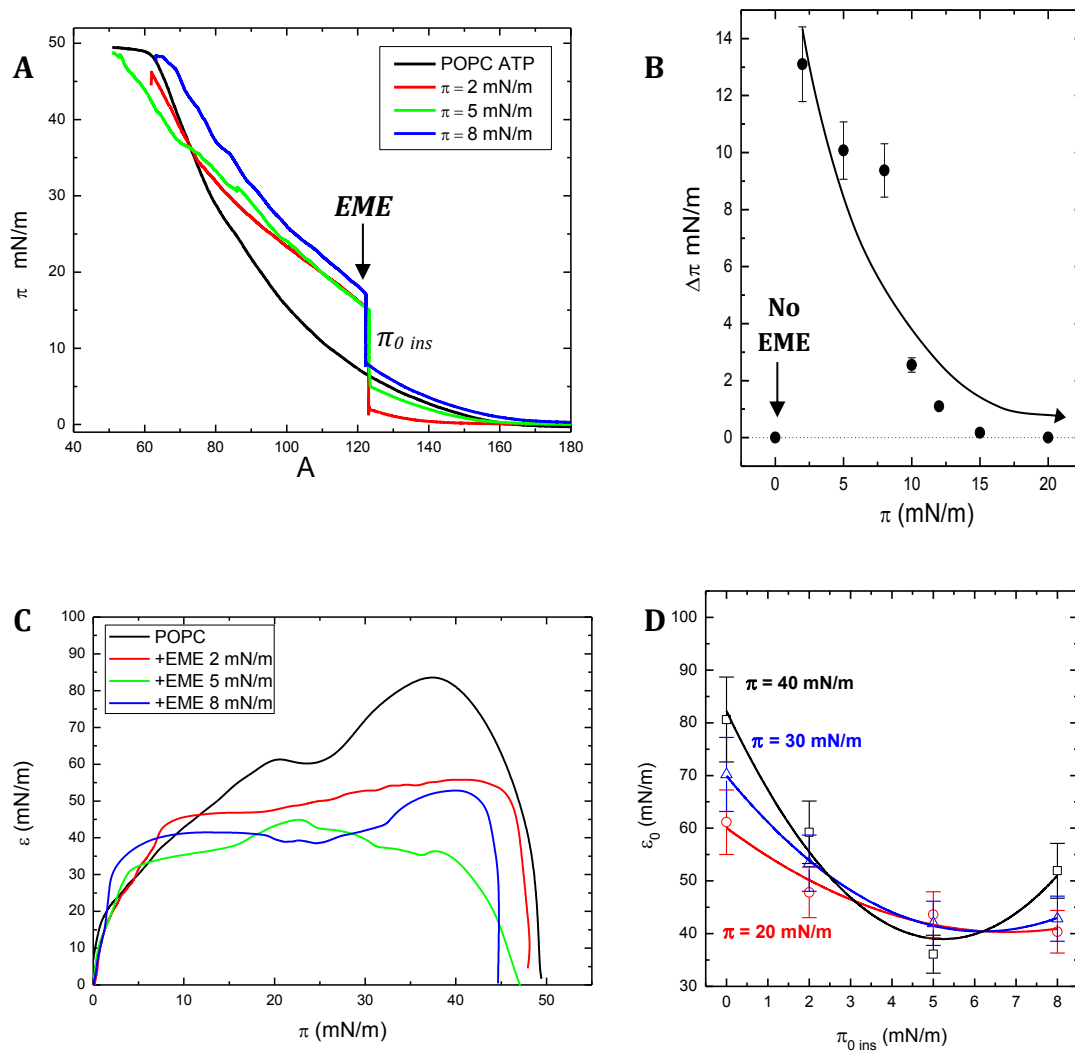


Figura 6.3-5: Experimentos en monocapas de Langmuir de POPC y extracto de membrana de glóbulo rojo en presencia de la disolución tamponada con ATP 2 mM. Se define π_0 ins como la presión inicial tras ser inyectado el extracto de membrana; A, isothermas de compresión para distintas presiones iniciales de lípido antes de la inyección de EME; B, variación de la presión al inyectar el extracto de membrana bajo la monocapa de POPC; C, variación del módulo de compresión para las distintas presiones iniciales de la monocapa frente a la presión de compresión; D, variación del módulo de compresión de la monocapa en función de la presión inicial de inserción para bajas (20 mN/m), medias (30 mN/m) y altas (40 mN/m) presiones de monocapa.

En este caso, al contrario que en ausencia de ATP, la variación de presión respecto a la presión inicial de inyección del extracto disminuye con el aumento de la presión inicial (Figura 6.3-5 B), siendo abrupta la disminución entre las presiones iniciales de 8 y 10 mN/m. En la Figura 6.3-5D se observa un comportamiento similar a los experimentos realizados sin ATP, sin embargo el rango de presiones iniciales es menor, es decir, el módulo elástico de compresión disminuye hasta valores de 35-40 mN/m para presiones iniciales de 5 mN/m sin embargo, a partir de dicha presión, aumentan ligeramente (Figura 6.3-5 C y D). Se podría interpretar como un reblandecimiento de la monocapa en presencia de ATP hasta 5 mN/m, sin embargo, a partir de dicha presión inicial, la membrana rigidifica ligeramente, sin embargo, parece contradicto-

rio que pese a dicha tendencia a rigidificarse a partir de los 5 mN/m, el aumento de presión de la monocapa tras la inyección disminuye drásticamente, hasta prácticamente no variar.

En el dibujo se representa esquemáticamente el proceso, en ausencia y presencia de ATP, al polimerizar la red de citoesqueleto si se aumenta la presión inicial de inserción del extracto de membrana bajo la monocapa de POPC.

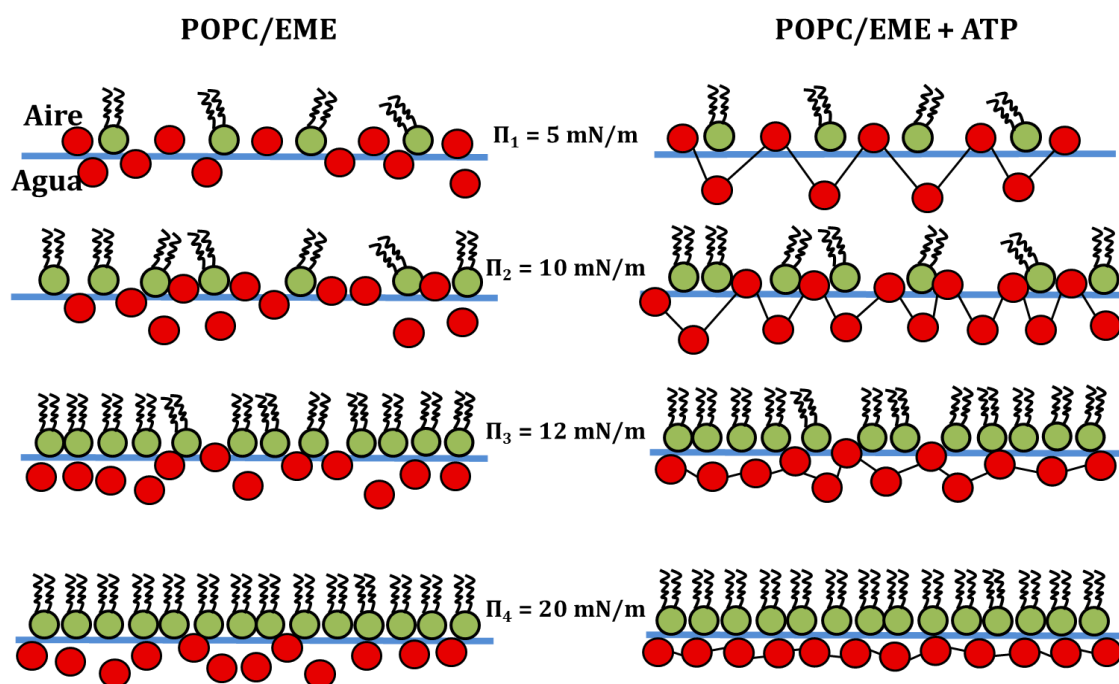


Figura 6.3-6: representación esquemática del proceso de inserción del extracto en la monocapa de POPC en función de la presión inicial, tanto en ausencia como presencia de ATP.

Este efecto de la disminución del módulo de elasticidad en presencia de una concentración 2 mM de ATP, planteó la duda de si existiría una variación de las propiedades de la monocapa en función de la concentración de ATP. Para ello se escogió una presión inicial de la monocapa de POPC donde fuera fácilmente observable la variación de la concentración de ATP, escogiéndose la presión de 5 mN/m donde se han llegado a observar los mayores cambios de presiones y por lo tanto, donde se cree que hay una mayor inserción del extracto de membrana en la monocapa de POPC.

Se tomaron cuatro concentraciones distintas de ATP, 0, 1, 2 y 5 mM en el medio de la disolución tamponada para evitar la desnaturalización de las proteínas del extracto de membrana, para una misma presión inicial. Los resultados obtenidos para cada experimento se encuentran resumidos en la siguiente figura.

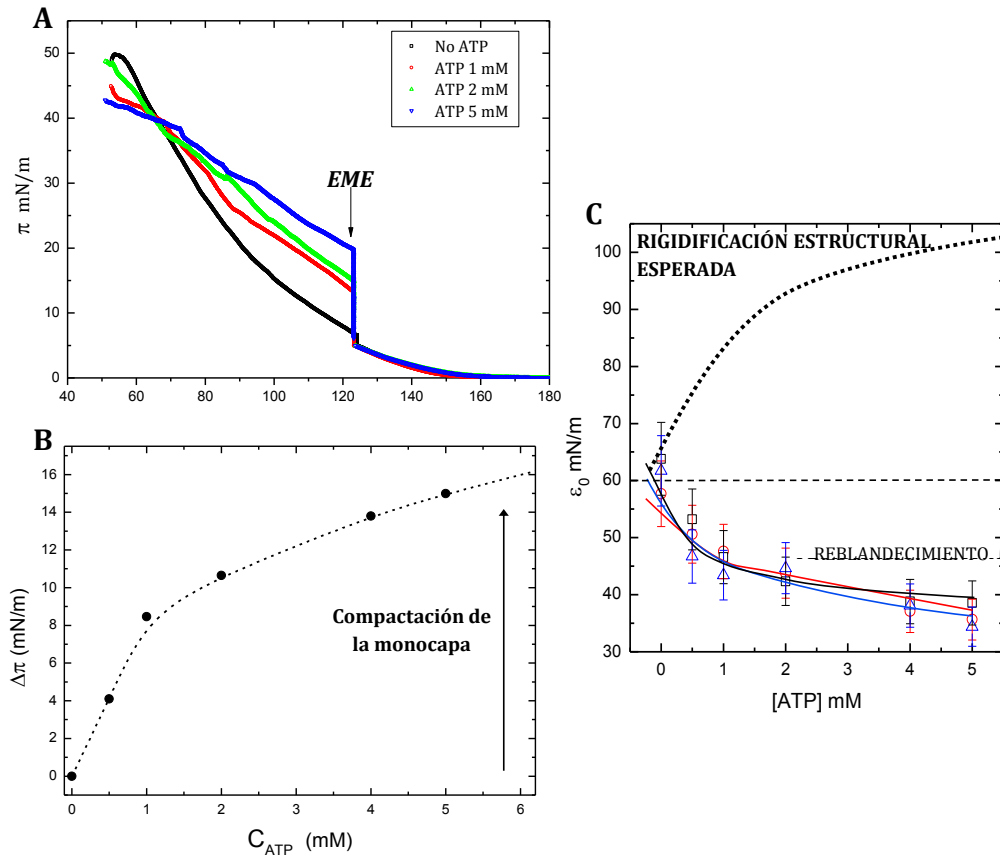


Figura 6.3-7: Resultados obtenidos al realizar las isothermas de compresión, siendo la presión de inserción del extracto de membrana de eritrocito 5 mN/m, para distintas concentraciones de ATP. A, Isothermas de compresión de las monocapas, en las que se observa un aumento de la presión superficial de membrana al realizar la inyección bajo monocapa del EME; B, relación de la variación de presión superficial en función de la concentración de ATP, donde se observa una tendencia a la compactación de la monocapa a mayores concentraciones de ATP; C, comportamiento del módulo elástico de compresión en función de la concentración de ATP, siendo en rojo a bajas presiones (20 mN/m), azul presiones medias (30 mN/M) y negro altas presiones (40 mN/m) de la monocapa. La línea punteada indica la tendencia esperada hacia la rigidificación de la monocapa a mayores concentraciones de ATP, mostrando un comportamiento de reblandecimiento de la monocapa.

En la Figura 6.3-7A se observa que a mayor concentración de ATP, las isothermas de compresión sufren un mayor aumento en la presión superficial de la monocapa, lo que muestra una gran actividad al aumentar la compactación de la monocapa (Figura 6.3-7B). Sin embargo, los resultados esperados deberían llevar a valores del módulo elástico de compresión mayores al polimerizar la red de citoesqueleto del extracto de membrana al aumentar la concentración de ATP (Figura 6.3-7C), pero lo obtenido es un reblandecimiento de la monocapa.

Para obtener mejores conclusiones acerca del comportamiento viscoelástico se realizaron nuevos experimentos con la balanza de Langmuir. Los experimentos consistieron en la realización de actos de compresión-expansión para evaluar el impacto mecánico del extracto de membrana en la monocapa, en ausencia de extracto de membrana de eritrocito como en presencia de la misma, ambas en disolución tamponada en presencia de ATP 5 mM.

En la Figura 6.3-8 se muestra el valor del módulo dinámico de compresión que concuerda con el valor de equilibrio $\varepsilon(\omega) \approx \varepsilon_0 \approx 83 \text{ mN/m}$. Al aumentar la frecuencia la pérdida del módulo es muy leve y la viscosidad es independiente del tiempo, $\kappa \approx \omega^0$. Por lo tanto, igual que sucedía en el capítulo anterior, la relajación no viscoelástica está presente en la monocapa de lípido en el rango dinámico considerado, correspondiendo a una membrana incompresible no muy afectada por los movimientos laterales difusivos lentos.

En presencia de extracto de membrana en medio tamponado y ATP, el módulo dinámico de compresión disminuye debido a la fluidificación activa que genera el extracto de membrana, como se observó en los experimentos estáticos. Al polimerizar la red citoesqueletal se produce una disminución leve en la viscosidad intrínseca, puede ser debida a que la dilatación lateral de la monocapa lipídica evita la inserción estable del extracto de membrana en la monocapa.

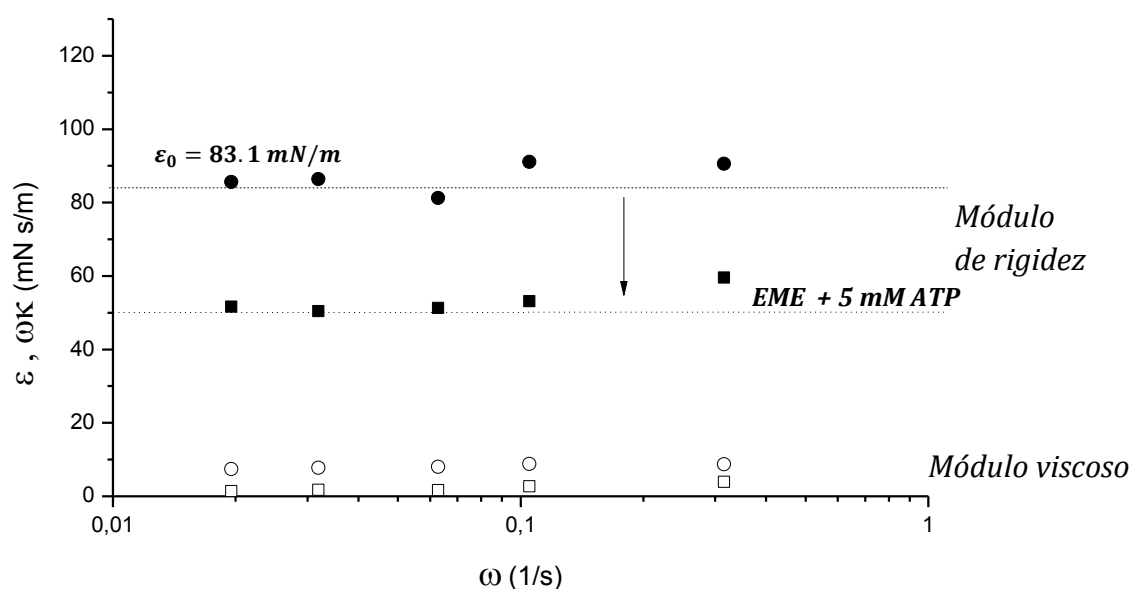


Figura 6.3-8: Medida del módulo dinámico de elasticidad ($\varepsilon(\omega)$ con símbolos rellenos) y la pérdida de viscosidad ($\omega\kappa(\omega)$ símbolos huecos) medidos en función de la frecuencia (ω) en experimentos con barrera oscilatoria con monocapas de POPC en medio tamponado con 5 mM ATP en ausencia de EME (●) y en presencia de EME (■). La línea punteada en horizontal corresponde al módulo de compresión de equilibrio (ε_0).

Todos estos resultados obtenidos mediante los estudios en monocapas de Langmuir muestran una tendencia a la fluidificación activa de la monocapa en presencia de ATP, siendo mayor cuanto mayor es la concentración de ATP. Sabiendo que el módulo de compresión nos indica la flexibilidad o rigidez de un sistema, si un sistema presenta grandes variaciones de presión (π) frente a pequeñas variaciones de área (A) se dice que el sistema es rígido y ordenado. Los resultados obtenidos se traducen en una disminución del módulo de compresión $\varepsilon_0 = -A(\partial\pi/\partial A)$, sin embargo, lo que cabría esperar es la rigidificación de la monocapa al formarse la red de citoesqueleto, puesto que es una estructura rígida.

Para poder profundizar más en este sistema, y debido a que el citoesqueleto conformado principalmente por espectrina, está unido a la membrana interna del glóbulo rojo, se decidió realizar estudios en sistemas tridimensionales de la membrana interna del glóbulo rojo.

6.3.2. Citoesqueleto en sistemas modelo RBC en 3D

Para la realización de los estudios en sistemas modelo de membranas de glóbulo rojo en 3D se formaron vesículas gigantes para la realización de tres estudios distintos: en primer lugar se realizó el estudio del diagrama de fases para la composición de la membrana interna del eritrocito compuesta de lípido sintético, para poder estudiar los rangos de formación y estructuras que se llegan a formar; en segundo lugar se incorporó parte de extracto de membrana de eritrocito en la composición de membrana interna para poder observar cómo afectan las proteínas la membrana interna de un sistema modelo del eritrocito; y por último se realizó el estudio de las propiedades mecánicas de los distintos sistemas mediante el método de las fluctuaciones de membrana.

6.3.2.1. Diagrama de fases con lípidos sintéticos

Para la realización de los diagramas de fases se prepararon vesículas unilamelares gigantes mediante la técnica de electroformación, descrita en el capítulo de Materiales y métodos, de sistemas cuaternarios compuestos por colesterol, fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE), para distintas composiciones de colesterol, desde el 0 al 50%, y siempre en relación a la composición fisiológica de la membrana interna.

El primer estudio que se realizó fue el diagrama de fases del contenido en lípido de la membrana interna en una composición de colesterol fisiológica (30%). Siendo la composición fisiológica aproximada de un 30-40% de colesterol, el otro tanto por ciento lo ocupan un 20% de PC, 30% PS y 50% PE.

Al realizar el diagrama de fases, manteniendo el 30% de colesterol, se observó que el punto fisiológico se encuentra en una zona muy cercana una zona inestable – o de no formación – y en una zona del diagrama en la que se observa una internalización de PE en forma de vesículas o estructuras en el interior de la vesícula (segregaciones), a la que llamaremos *fase Ld+3D*. De forma esquemática se representan las estructuras observadas en los diagramas de fases estudiados en la Figura 6.3-9.

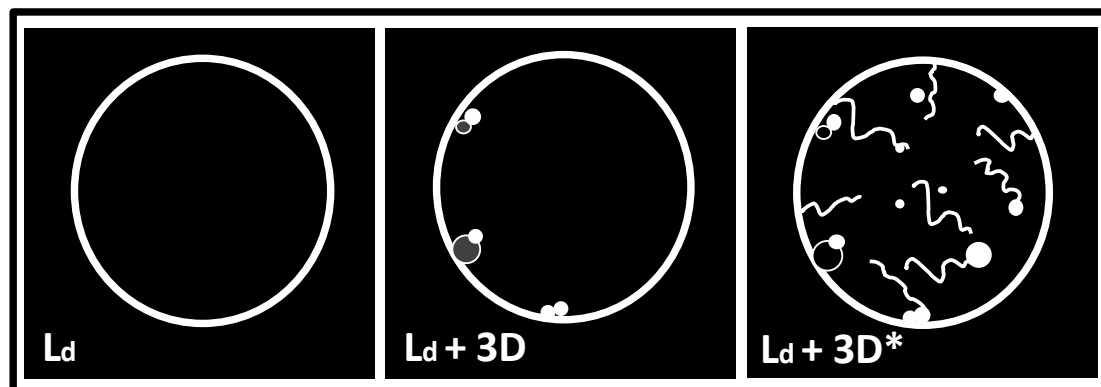
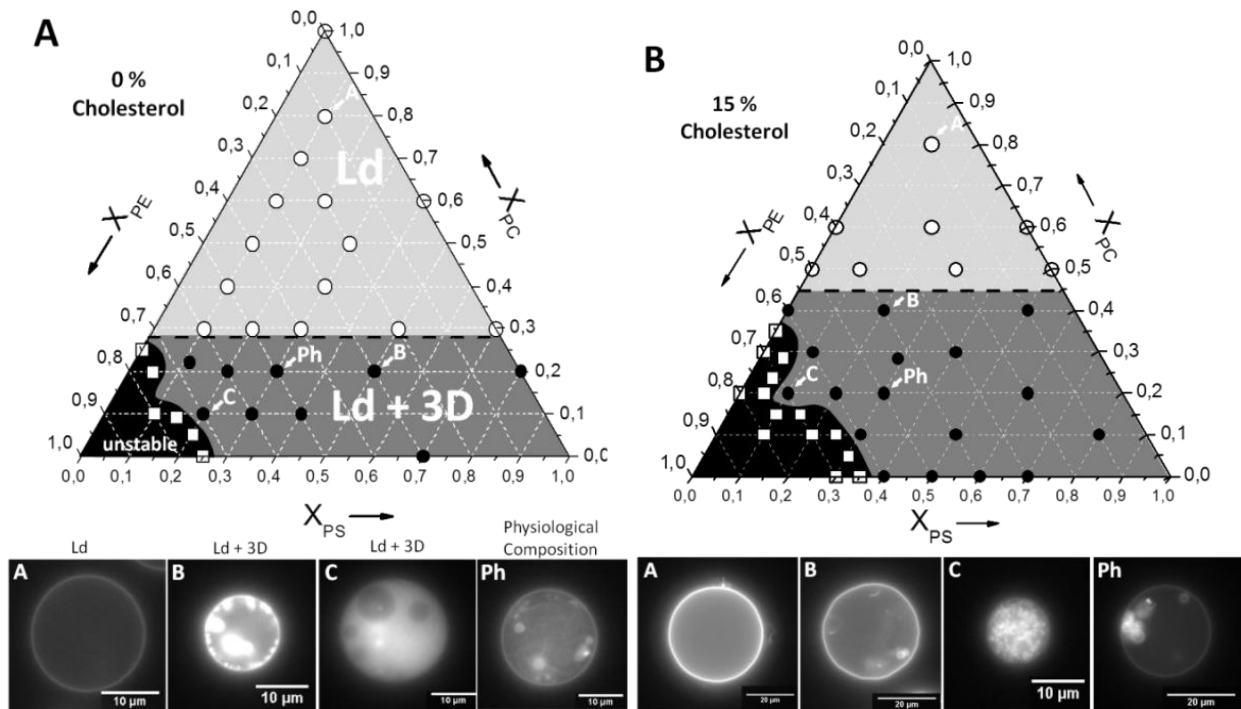


Figura 6.3-9 Esquema de las distintas fases Ld, y Ld + 3D. Ésta última presenta dos tipos esquemáticos según la proximidad a la zona de inestabilidad (más inestable Ld + 3D*).

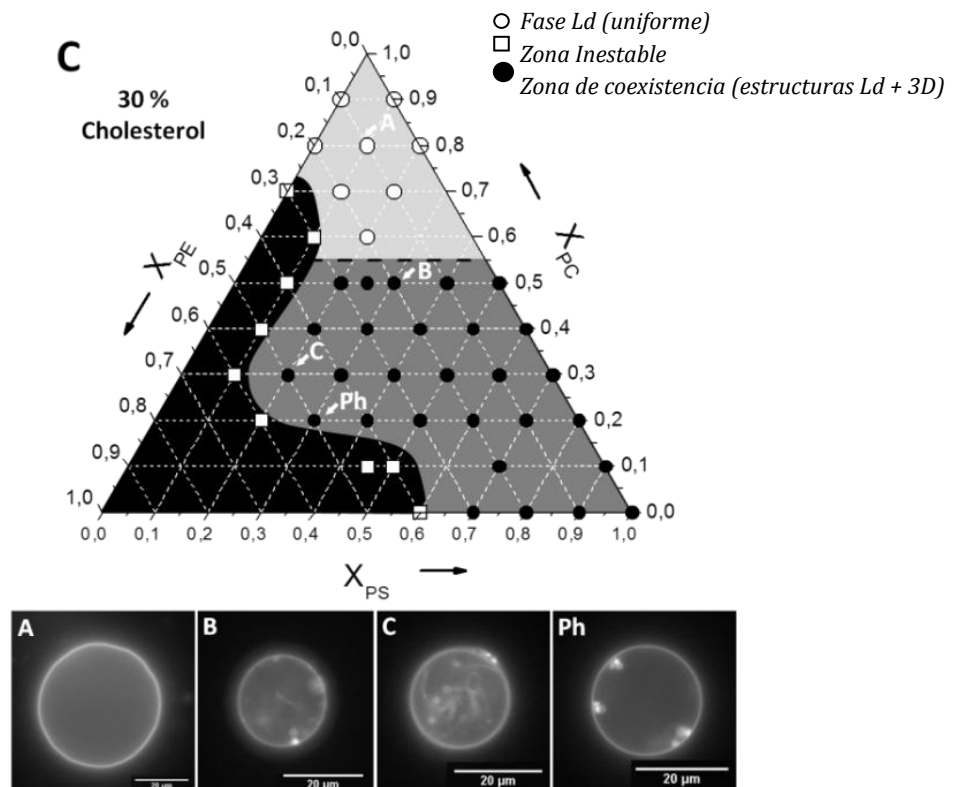
Para obtener mayor información acerca de este punto fisiológico se realizaron los diagramas de fases variando la proporción de colesterol. Los resultados obtenidos nos mostraron que al ir aumentando la proporción de colesterol (de 0 al 50%) la zona de uniformidad de fases disminuye y la segregación de lípido va en aumento manteniéndose el punto fisiológico estable en todos los casos, muy cerca de la zona de inestabilidad.

La variación de la zona estable puede deberse a que, PE y PS disminuyen la estabilidad al incrementar la concentración de colesterol. Estudios realizados en monocapas de Langmuir por *P. Wydro* (7) muestran que tanto monocapas de PE/Chol, PS/Chol, cuando la cantidad de colesterol es significativa en el entorno fisiológico (30-40%) existen interacciones repulsivas. Sin embargo, en monocapas ternarias de PE/PS/Chol, se observan más repulsiones siendo inestable a cualquier concentración de colesterol. La monocapa se estabiliza en disolución salina, al disminuir la interacción repulsiva haciendo la mezcla más favorable.

Una vez realizados los experimentos, se puede separar en tres tipos de fases: fase inestable (negro), fase uniforme (Ld, gris claro) y fase de coexistencia, entre la fase uniforme y la segregación de estructuras con forma de túbulos o exceso lipídico (Ld + 3D, color gris oscuro) (ver Figura 6.3-9). En la Figura 6.3-10 se muestran los distintos diagramas de fases obtenidos en este estudio.



Leyenda



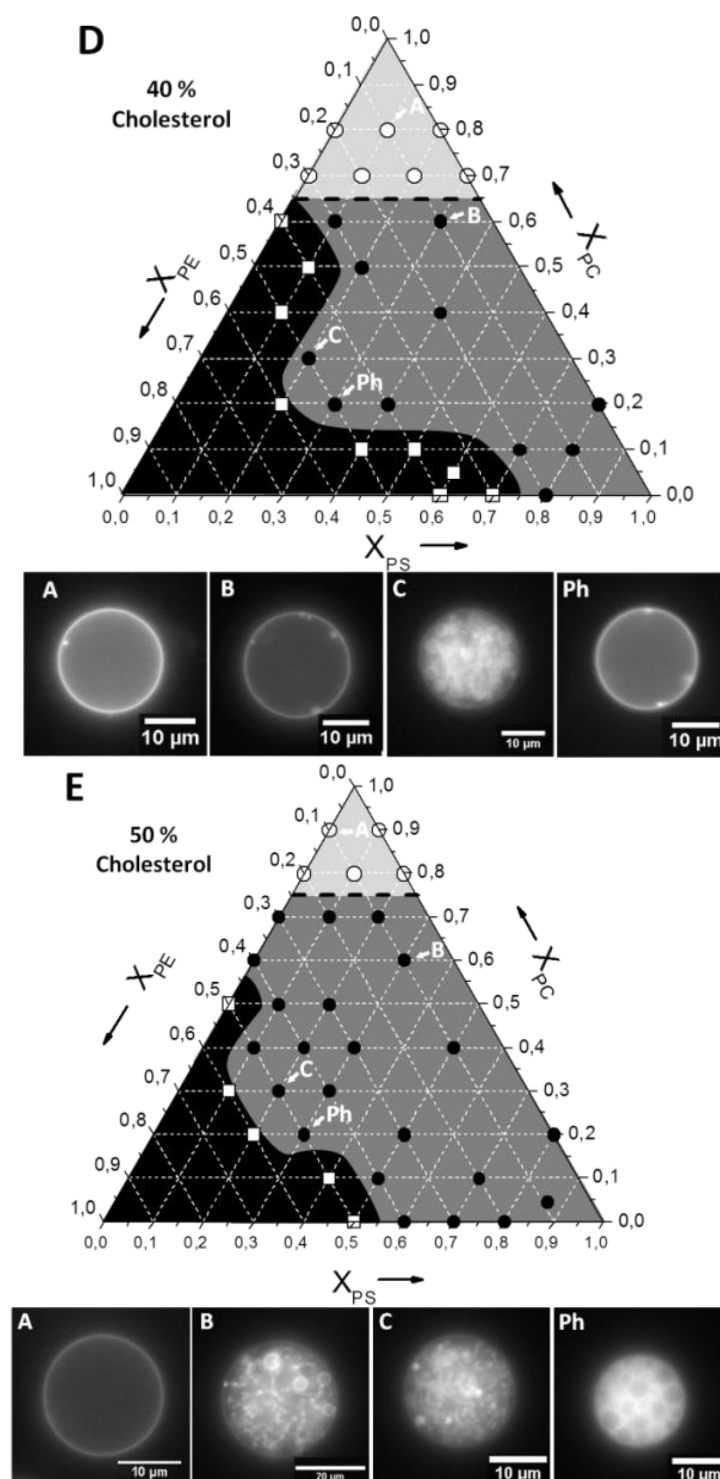


Figura 6.3-10: Diagramas de fases estudiados con imágenes características de las zonas del mismo: (a) diagrama de fases con 0% chol, (b) diagrama de fases con 15% chol, (c) diagrama de fases con 30%, (d) diagrama de fases con 40%, (e) diagrama de fases con 50%. En cada uno se muestran las imágenes más representativas de las zonas observadas.

Una de las características que llama más la atención de los diagramas obtenidos es que el punto de composición lipídica fisiológica (punto denotado como **Ph**) se mantiene en la zona de estabilidad de la bicapa con segregación de lípido sea cual sea la composición de colesterol (Figura 6.3-11), lo cual sugiere que el colesterol es un componente que puede estar presente en contenidos variables sin alterar esencialmente la estabilidad termodinámica de la membrana.

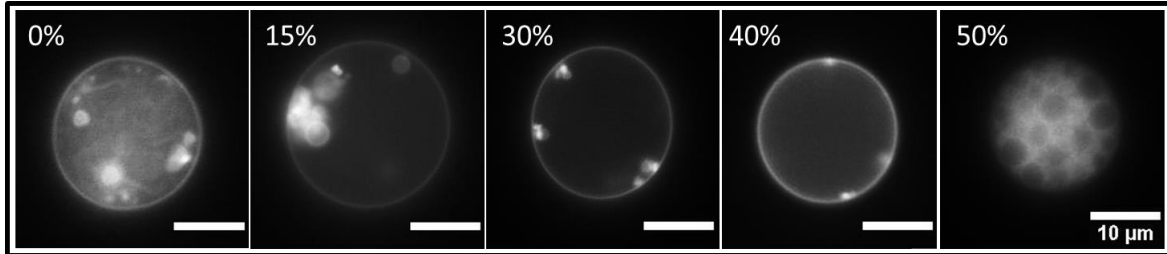


Figura 6.3-11 En esta imagen se observa la evolución de la zona de composición fisiológica según la proporción de colesterol.

La zona de uniformidad disminuye paulatinamente con el contenido de colesterol, siendo más abundante la formación uniforme al 0% en colesterol y siendo una zona muy reducida al 50% en colesterol. Si se representan los datos de la variación de colesterol frente a la composición de PE se ve una clara disminución de la zona de estabilidad. Con la tendencia de los datos, suponiendo que pueden existir dos tipos de comportamiento – lineal o parabólico – se podría predecir cuál sería la cantidad máxima de colesterol que es capaz de soportar el sistema. La zona sombreada que se encuentra entre el 30 y 40% de colesterol correspondiente a la zona de composición fisiológica, se encuentra muy cercana a esta línea de segregación.

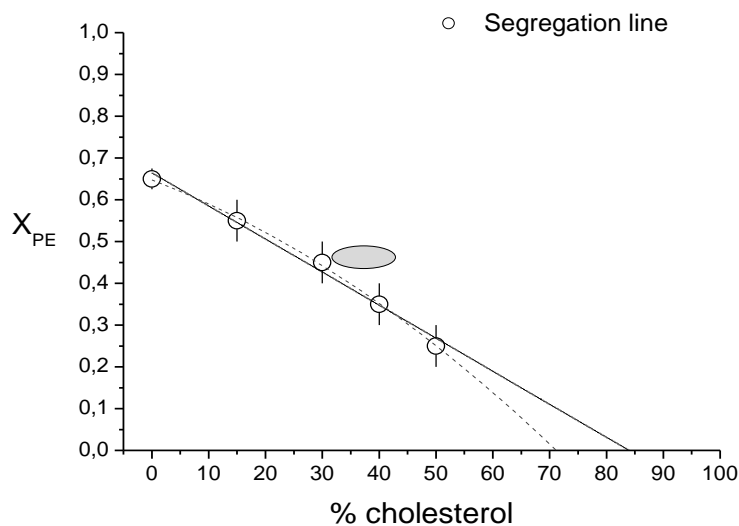


Figura 6.3-12: Variación del porcentaje en colesterol frente a la composición de PE. En él se representan las dos líneas de tendencia, tanto lineal como parabólica. La zona sombreada en gris representa el intervalo característico de la composición fisiológica.

La razón por la que sucede esta disminución de zona uniforme se puede razonar por la asociación del colesterol con PC. El colesterol tiene gran afinidad con este lípido pero cuando aumenta la cantidad de lípidos como PE, por interacciones estéricas, repulsa al colesterol. Un modo sencillo de verlo es con el dibujo de la Figura 6.3-13.

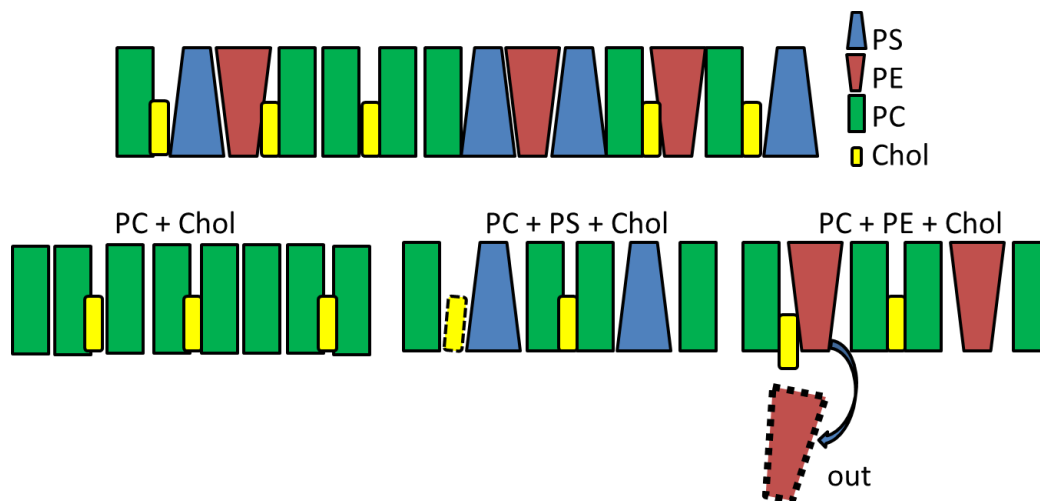


Figura 6.3-13: dibujo esquemático de una monocapa con distintas composiciones de lípidos. Abajo a la derecha se encuentra representada la repulsión estérica del PE-Chol.

En este esquema se pretende ilustrar la estructura en función de la forma simplificada de las moléculas lipídicas. La primera imagen, arriba, correspondería una membrana con todos sus componentes, teniendo en cuenta la geometría que presentan los lípidos en función del número y tamaño de la zona polar y apolar. Cuando sólo hay presencia de PC con colesterol, o cuando el lípido PC es el componente mayoritario, la membrana es uniforme, no hay exclusiones. Cuando aumenta la participación de PS con PC, se forman vesículas pero el colesterol tiende a unirse a la PC aunque la interacción de las cargas PS-Chol también es estable. Sin embargo, si hay una participación alta de PE en la membrana de PC + Chol, este último no es estable cerca del PE de tal modo que el *PE tiende a excluirse* de la membrana formando pequeñas vesículas en el interior o formando filamentos (7; 8; 9; 10). Esto es lo que se observa en el diagrama de fases como zona de coexistencia de fases Ld+3D.

Para conocer la naturaleza de estas *segregaciones* se realizaron experimentos con la misma composición pero con los lípidos marcados con distintas sondas fluorescentes: Rh-PE, NBC-PC y FM-143. Los lípidos marcados fluorescentemente con Rodamina-PE (Rh-PE) nos indica un alto contenido en el lípido PE; lípidos marcados con NBD-PC, indican un alto contenido en PC. Lo observado con estas sondas fluorescentes fue que en presencia de Rh-PE, las segregaciones presentaban una elevada fluorescencia, no sólo en las segregaciones, también en la membrana lipídica, con la sonda NBD-PC las segregaciones también mostraban fluorescencia, pero de menor intensidad, indicando que son restos de la membrana no estables en la misma y por ello se segregan, tanto hacia el interior como hacia el medio exterior.

Para comprobar si estas segregaciones partían de la membrana o una vez segregadas eran independientes, se agregó la sonda FM-143. Ésta es una sonda lipofílica, lo que significa que se unirá a cualquier zona donde existan lípidos, y si hay canales pasará a través de ellos invadiendo el interior de la vesícula de fluoróforo. Esta sonda se emplea una vez están formadas las vesículas y al ser añadida a la celda de observación en el medio tiñe la membrana externa o cualquier zona con contenido lipídico. Lo observado tras añadir esta sonda fue que sólo mostraba fluorescencia la membrana externa y no tenía acceso a las segregaciones interiores de la membrana, confirmando así que no existe comunicación ni conexión de la membrana al interior, simplemente se trata de segregaciones o extensiones de la membrana interna (Figura 6.3-14).

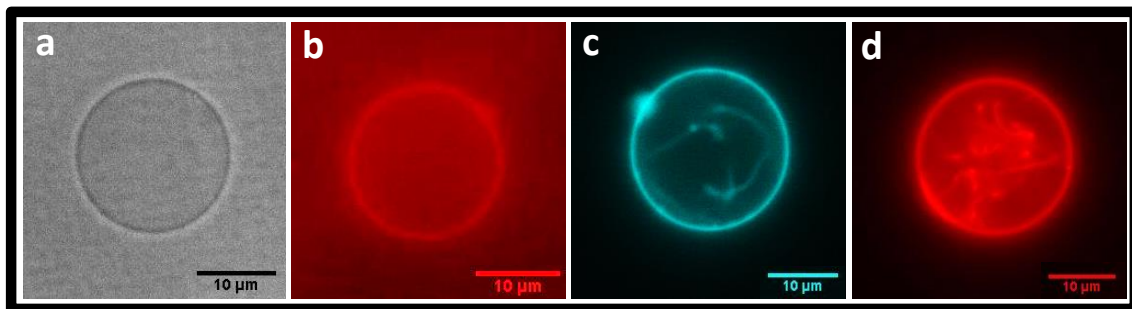


Figura 6.3-14: Imágenes de dos experimentos distintos (*a*, *b* y *c* son parte del mismo experimento y *d* es distinto, ya que las sondas FM-143 y RhPE emiten en el mismo canal) marcados con las distintas sondas fluorescentes para comprobar si los filamentos internos están conectados con la membrana externa de las GUVs. *a*. Imagen en campo claro; *b*. imagen de una vesícula marcada con la sonda lipofílica FM-143 (no es capaz de atravesar la membrana, por lo que si existieran filamentos conectados de la membrana externa hacia el interior se vería algo); *c*. imagen de una vesícula marcada con la sonda fluorescente NBD-PC; *d*. imagen de una vesícula marcada fluorescentemente con Rh-PE.

Los experimentos con los distintos tipos de sondas fluorescentes han sido claves para conocer la principal composición lipídica de las segregaciones hacia el interior de las vesículas. La sonda fluorescente FM-143, al no mostrar fluorescencia en el interior de la vesícula explica que las segregaciones no son invaginaciones de la membrana hacia el interior, ni posibles canales lipídicos que permitan el paso de la fluorescencia, por lo que estas segregaciones podrían formar parte de la membrana interna o ser fragmentos independientes de la membrana. La alta fluorescencia obtenida con Rh-PE indica un alto contenido en fosfatidiletanolamina, lípido afín a zonas con gran curvatura, lo que explica la formación de segregaciones con estructura filamentosa, estabilizadas por fosfatidilcolina, marcada fluorescentemente con la sonda NBD-PC.

¿Porqué estos filamentos, o segregaciones lipídicas, en las mezclas de composición de membrana interna modelo si los glóbulos rojos no muestran ninguna alteración en la membrana similar? Para poder profundizar en las segregaciones lipídicas de la membrana, en los siguientes epígrafes se muestra el estudio realizado al incorporar parte del extracto de membrana de glóbulo rojo a la composición lipídica de membrana interna artificial.

6.3.2.2. Lípido sintético en presencia de EME

La espectrina es una proteína de citoesqueleto del eritrocito que interactúa con los lípidos de la membrana a través de la anquirina y la proteína 4.1R. Para este experimento se ha trabajado con un extracto de membrana de eritrocito y con una parte mayoritaria de mezcla lipídica artificial en la composición fisiológica.

Al introducir la membrana del glóbulo rojo, la cual contiene no sólo los lípidos de la membrana sino también las diversas proteínas de membrana y citoesqueleto, se tuvo que variar el proceso de preparación de las muestras. El proceso es una variación de *Montes et Al* (10), en el que se emplea una mezcla de lípidos concentrados con *RBC*^{****}.

Al realizar los experimentos con el método de electroformación en condiciones de lípido concentrado distintas a las empleadas para la realización de los diagramas de fases, se obtuvieron vesículas unilamelares gigantes en mayor concentración de vesículas por área. En la Figura 6.3-15B, se observa una imagen de la muestra de lípido sintético en presencia de EME, donde las vesículas obtenidas tienen, muy pocas, o ninguna, segregaciones hacia el interior en un medio de observación tamponado para evitar la desnaturalización de las proteínas presentes.

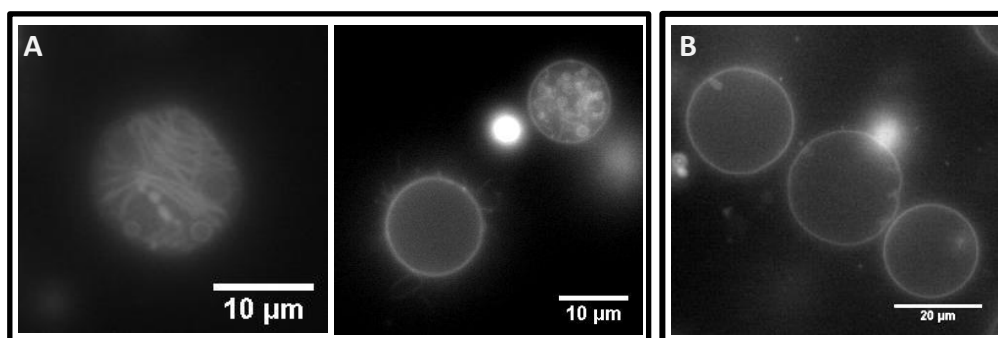


Figura 6.3-15: Imágenes tomadas bajo el mismo método de electroformación de lípidos sintéticos (A) en ausencia de proteína (EME) y (B) en presencia de proteína (EME).

Debido a que no se observaban tantas segregaciones como las obtenidas sin extracto de *RBC*, se realizaron una serie de experimentos control manteniendo las mismas condiciones de la nueva metodología de electroformación con lípido concentrado, para comprobar que en presencia de extracto de *RBC* no afectaba a la formación de las vesículas en la composición fisiológica. Los resultados obtenidos de este control mostraron que se obtienen el mismo tipo de *GUVs* que con el método empleado antes, pero al ser mayor la concentración de lípidos, la concentración de *GUVs* también era mayor. De este modo se podía observar la aparición de los filamentos internos Figura 6.3-15A *izquierda*, y también se aprecia que estos filamentos no sólo están presentes en el interior, sino que también se encuentran en el exterior de las mismas Figura 6.3-15A *derecha*.

^{****} El procedimiento está explicado en el apartado 6.2.3 de este capítulo.

POLIMERIZACIÓN DE LA ESPECTRINA

La *espectrina*, como toda proteína de citoesqueleto, necesita una fuente de energía para polimerizar y en este caso, la fuente de energía son moléculas de ATP (1).

En estudios realizados por López-Montero *et al.* (11), fueron capaces de reconstituir el citoesqueleto completo de espectrina en GUVs. Siguiendo el mismo procedimiento, al estar en presencia de un porcentaje, aunque bajo, de *EME* se podría realizar una reconstitución parcial del citoesqueleto, ya que los lípidos presentes en la mezcla se encontraban en los porcentajes adecuados de la composición fisiológica.

Al añadir ATP, a concentración 2 mM, a la preparación de GUVs, éste desencadena la polimerización de la espectrina contenida en el extracto lipídico de RBC. Lo que se observó fue que al polimerizar la espectrina, esas segregaciones que se habían observado desaparecen dando lugar a unas redes proteicas que corresponden a la espectrina polimerizada tomando la fluorescencia de los lípidos (Figura 6.3-16). Como se comentó anteriormente, se podría decir que estas segregaciones hacia el interior son mayoritariamente de PE y, al polimerizar (12), la espectrina se asocia con ésta dando lugar a una sub-estructura y formando una vesícula de composición uniforme y estable. Con esto se puede llegar a demostrar que la espectrina es capaz de *estabilizar* estos lípidos de PE y los emplea como punto de anclaje para formar una red polimérica aportando una estructura firme a la membrana interna (13; 14).

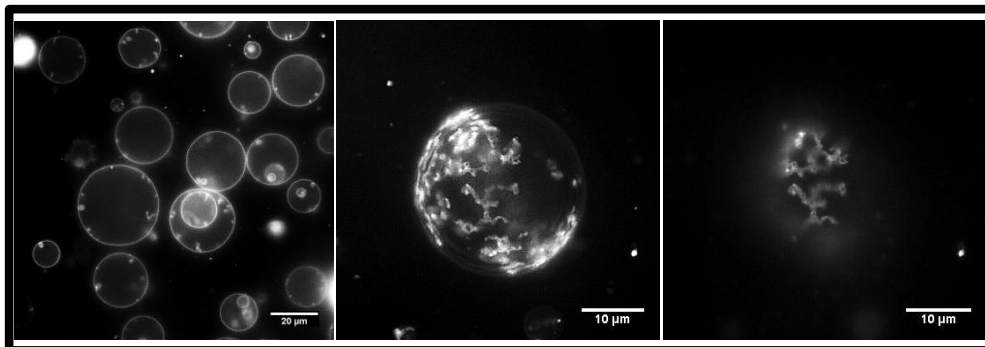


Figura 6.3-16: en la imagen A, se observan vesículas con extracto de membrana de eritrocito en presencia de la disolución tamponada. A su derecha, B, la imagen de una vesícula con extracto de RBC en presencia de ATP 2 mM. Esta imagen está hecha mediante tomografía a lo largo del eje z, de mezcla lipídica artificial en un 80% y el 20% restante es extracto de glóbulo rojo. La espectrina en presencia de ATP polimeriza, pero no forma las redes características entrecruzadas del glóbulo rojo debido a que hay mayor cantidad de lípido que de proteína; en C se muestra una toma de la base de la vesícula en B, donde se observa la espectrina polimerizada.

Para poder tener una mejor aproximación de la estabilización de PE en presencia de espectrina, se realizó un diagrama de fases al 30% de colesterol, pero en presencia de un 20% de extracto de glóbulo rojo y así, estudiar su comportamiento.

6.3.2.3. Diagrama de fases con extracto de RBC

Los resultados que se obtuvieron al realizar el diagrama de fases fueron muy interesantes (Figura 6.3-17).

Si se comparan los diagramas del 30% de colesterol tanto en ausencia (Figura 6.3-17 derecha) como en presencia de EME (Figura 6.3-17 izquierda), se observa que la línea de segregación tiene un comportamiento completamente distinto, ha pasado de ser una línea uniforme en función de la composición de PC, a ser variable en función de los tres componentes presentes en el diagrama.

Como puede observarse, a elevados contenidos de PE, la zona *Ld* (uniforme) es mucho mayor, sin embargo, sólo alcanza el 50% para contenidos en PC. El punto de composición fisiológica se sigue observando en la zona de formación estable con segregación lipídica, sin embargo, como se observó en el epígrafe anterior, al añadir ATP, se torna estable formando una red de citoesqueleto parcial de espectrina. Es destacable que la zona de no formación se ha reducido notablemente, lo que indica que la incorporación de una estructura citoesqueletal, aporta estabilidad termodinámica a la membrana, permitiendo una mayor participación de PE en la membrana. En la imagen adjunta característica de la zona fisiológica no se muestran grandes segregaciones ya que en estos casos no son tan notables como en los antes estudiados sin extracto de RBC.

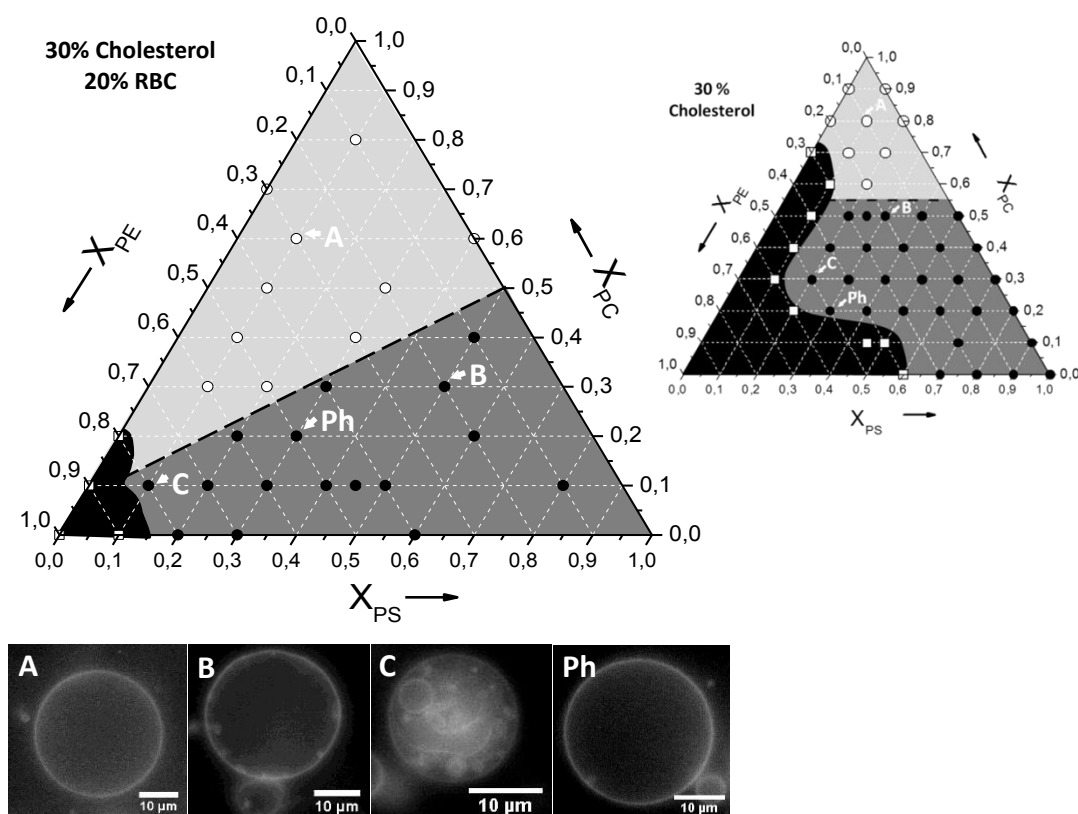


Figura 6.3-17 Diagrama de fases al 30% en colesterol y con un 20% de extracto de RBC con las correspondientes imágenes características de cada zona.

Volviendo a la gráfica anterior en la Figura 6.3-12, donde se estudiaba la estabilidad en función de la cantidad de PE y colesterol, si se añade el dato del diagrama de fases en presencia de EME, se observa un gran cambio en la zona de estabilidad de hasta cinco puntos en función de la composición de PE.

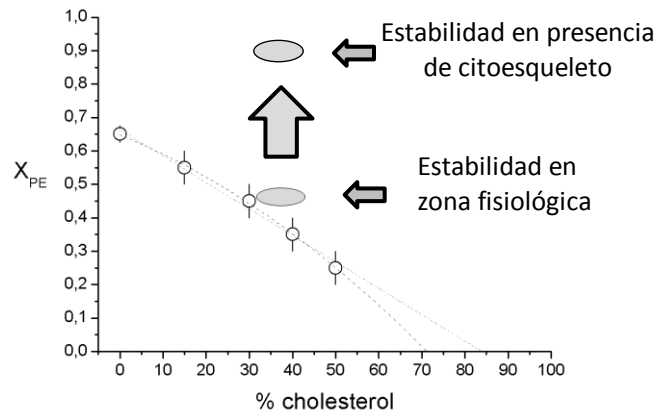


Figura 6.3-18: Variación del porcentaje en colesterol frente a la composición de PE. La zona sombreada en gris representa el intervalo característico de la composición fisiológica, viéndose aumentada la estabilidad en presencia del EME aportando una red de citoesqueleto parcial.

6.3.2.4. *Mecánica de membranas*

Hasta ahora, los resultados obtenidos muestran una clara variación de la estabilidad termodinámica, las membranas se estabilizan y son capaces de mantener una estructura estable pese al alto contenido en lípido PE, al insertar una red proteica en el seno de la bicapa lipídica. Debido a este hecho, hizo que se plantearan varios estudios de mecánica de membranas.

Para realizar el estudio de la variación de las propiedades mecánicas de la membrana, al variar la composición, se empleó la técnica de análisis de espectro de fluctuaciones, mediante la cual se obtuvieron los resultados para el módulo de curvatura o “*bending*” y de tensión lateral de membrana, de los distintos escenarios.

Para poder realizar el estudio de fluctuaciones de la membrana, se tomaron distintos videos de vesículas para poder realizar el análisis de contorno de imagen, compuestas de lípido sintético en composición de la membrana interna del glóbulo rojo y lípido sintético con un 20% de EME.

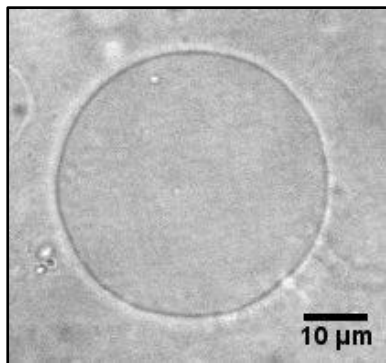


Figura 6.3-19: imagen tomada de uno de los vídeos empleados para obtener el módulo de bending y tensión lateral de la membrana, compuesto por mezcla de lípido sintético al 80% y 20% de EME.

A partir del vídeo tomado, se extraen todas las imágenes y se realiza un análisis de contorno, de tal modo que se detectaran las fluctuaciones de la membrana como cambios locales de la posición de la membrana en el plano ecuatorial. El espectro de fluctuaciones se obtiene a partir de la transformada de Fourier de los contornos empleando MATLAB y viene representado como la amplitud de las fluctuaciones frente al vector de onda ($q = n/R$, donde n es el número de modo y R el radio).

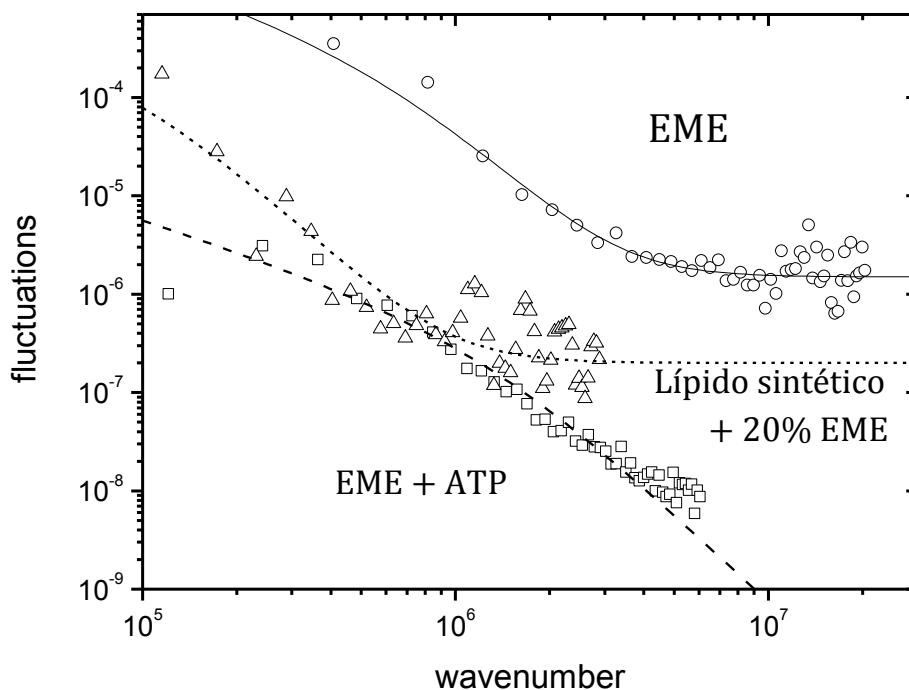


Figura 6.3-20: Espectro de fluctuaciones para el EME tanto en presencia como ausencia de ATP y espectro de fluctuaciones de la mezcla de lípido sintético con el 20% de EME. Se observa que en ausencia de ATP hay un residuo con un valor aproximado de 2×10^{-6} , igual ocurre con la mezcla de lípido y EME al 20% que queda un residuo de un orden de magnitud inferior. El régimen de flexión está dominado por q^{-3} y el de tensión por q^{-1} .

En la Tabla 6.3-1 se adjuntan los resultados obtenidos de los experimentos que se han realizado en este trabajo junto con los resultados que se obtuvieron en trabajos anteriores pertenecientes al grupo de investigación para el POPC, POPC con 30% de colesterol, para el extracto lipídico del RBC, para el extracto de membrana de RBC y para el propio RBC.

	κ ($k_B T$)	κ (+ ATP) ($k_B T$)	σ ($\mu N/M$)	σ (+ ATP) ($\mu N/M$)
POPC	10 (± 0.8)	—	0.08 (± 0.02)	—
POPC + Chol 30%	30 (± 1.4)	—	0.10 (± 0.02)	—
Lípido sintético MI	300 (± 20)	—	0.28 (± 0.01)	—
Extracto lipídico §§§§§	54 (± 12)	—	0.29 (0.07)	—
Lípido sintético MI + 20% EME	284 (± 20)	> 300	0.19 (± 0.01)	0.19
Extracto RBC	90 (± 5)	120 (± 11)	0.17 (± 0.02)	1.1 (± 0.2)
RBC _h *****	—	65.6 (± 0.6)	—	0.23(± 0.1)
RBC _d ++++++	121.5(± 0.8)	—	7.2 (± 0.6)	—

Tabla 6.3-1: Resultados obtenidos para los distintos sistemas estudiados en la presente tesis y resultados obtenidos de la bibliografía o cedidos, de los valores del módulo de *bending* y tensión de membrana, tanto en ausencia como presencia de ATP (13; 17; 18).

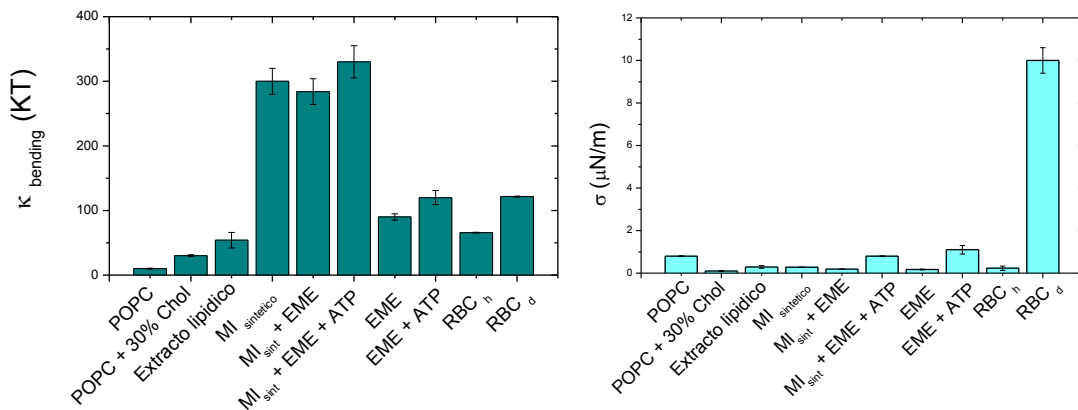


Figura 6.3-21: promedio de las constantes obtenidas, representadas en la Tabla 6.3-1, de los experimentos realizados con su error correspondiente. A la izquierda los valores correspondientes al módulo de bending (κ) y a la derecha los correspondientes a la tensión lateral de la membrana (σ) para los distintos escenarios lipídicos.

Los resultados muestran que en ausencia de proteína, sólo con lípido sintético en composición de membrana interna las muestras son completamente rígidas del mismo modo que en la mezcla de lípido sintético de membrana interna con el 20% del extracto de glóbulo rojo, éste último aumentando al añadir ATP, indicando que en presencia de proteínas de citoesqueleto la estabilidad de la membrana aumenta Figura 6.3-21.

§§§§§ Datos cedidos por el investigador Ruddi Rodríguez, de la Utrecht University.

***** Llamamos en este caso a RBC_h al eritrocito sano, es decir, en presencia de ATP.

+++++ Llamamos en este caso a RBC_d al eritrocito drogado, es decir, sin ATP.

A medida que se aumenta la complejidad del sistema, aumenta también la rigidez de la membrana. Es destacable, para lípidos sintéticos de membrana interna, tanto en ausencia como presencia de extracto de membrana, su rigidez es muy elevada, sin embargo, el módulo de *bending* para el extracto de membrana de eritrocito es un orden de magnitud inferior y para todo el sistema completo, es decir, para el eritrocito, su módulo es, prácticamente la mitad. Acorde con las funciones biológicas del glóbulo rojo, éste necesita tener una gran flexibilidad en la membrana para ser capaz de circular por los vasos sanguíneos y capilares. Si es así, ¿a qué se deben estas diferencias tan notables en sus módulos de rigidez si está presente el extracto de membrana?

Al realizar las vesículas mediante el método de electroformación, la red de citoesqueleto presente en el extracto de membrana se encuentra tanto en el interior como exterior de la vesícula. Al añadir ATP polimeriza la espectrina formando una red que recubre la vesícula, mientras que en un eritrocito, la red de espectrina está en el interior. Con estos experimentos y datos obtenidos lo que se llega a comprender mejor es la rigidez estructural presente en el interior del glóbulo rojo capaz de soportar las altas presiones al pasar de vasos a capilares sanguíneos.

6.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha corroborado que las proteínas de citoesqueleto aportan unas propiedades mecánicas de flexibilidad y estabilidad a los lípidos de la membrana que permiten al glóbulo rojo circular por el torrente sanguíneo con gran facilidad. También que las proteínas del eritrocito admiten grandes cantidades de PE en condiciones fisiológicas debido a la interacción estabilizante de la PE con la espectrina del citoesqueleto.

Se ha observado que las membranas son más fluidas en presencia de citoesqueleto y éste aporta una mayor estabilidad, soportando altas variaciones de presión a altas compresiones.

Se ha estudiado el comportamiento de la membrana interna del eritrocito en función de la variación de colesterol en la membrana observándose zonas de formación con segregaciones de PE y el límite de no formación o de estabilidad de la membrana, tanto en composición puramente de lípido sintético de membrana interna como con la adición a esa mezcla de extracto de membrana de RBC.

6.5. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría terminar el capítulo agradeciendo a todas las personas que han participado de una manera directa o indirecta en este trabajo. Agradecer a Isabel Uruburu, Pilar Peñas y Carmen Mateos por su ayuda experimental en este trabajo, agradecer a Michael Mell y Ruddy Rodríguez por crear el algoritmo y poder realizar así los análisis de fluctuaciones y por último agradecer a Iván López-Montero por guiarme en este trabajo.

REFERENCIAS

1. **Yawata, Y.** *Cell Membrane: the Red Blood Cell as a model*. s.l. : WILEY-VCH, 2003.
2. *Erythrocytes*. **Migliaccio, Anna Rita F y Whitsett, Carolyn.** [ed.] Ltd. John Wiley & Sons. 2013, eLS - Immunology.
3. **Alberts, Bruce, y otros, y otros.** *Molecular Biology of the Cell*. 5. s.l. : Garland Science, 2008.
4. **Karp, Gerald.** *Cell and molecular biology. Concepts and experiments*. United States of America : John Wiley & Sons, Inc, 2010.
5. *Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells*. **Robert F.A. Zwaal, Alan J. Schroit.** 4, 1997, Blood - The Journal of The American Society of Hematology, Vol. 89, págs. 1121-1132.
6. *Lipid sorting in epithelial cells*. **K., Simons y G., Van Meer.** 1988, Biochemistry, Vol. 27, págs. 6197-6202.
7. **Quinn, Peter J.** Plasma membrane phospholipid asymetry. *Phospholipid Metabolism in Apoptosis*. s.l. : Springer US, 2002, Vol. 36, 3, págs. 39-60.
8. *The interactions between cholesterol and phospholipids located in the inner leaflet of humane erythrocytes membrane (DPPE and DPPS) in binary and ternary films – The effect of sodium and calcium ions*. **Wydro, Pawel.** 82, 2011, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, págs. 209-216.
9. **Sackmann, E.** Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles. *Handbook of Biological Physics*. s.l. : Elsevier Science B.V., 1995, Vol. 1, 5, págs. 213-303.
10. *Physics meets Biology. From Soft Matter to Cell Biology: Fluid vesicles*. **Seifert, U.** 2004, Lecture Notes.
11. *The cholesterol content of the erythrocyte membrane is an important determinant of phosphatidylserine exposure*. **Rob van Zwieten, Andrea E. Bochem, Petra M. Hilarius, Robin van Bruggen, Ferry Bergkamp, G. Kees Hovingh, Arthur J. Verhoeven.** 1921, 2012, Biochimica et Biophysica Acta, págs. 1493-1500.
12. *Giant Unilamellar Vesicles Electroformed from Native Membranes and Organic Lipid Mixtures under Physiological Conditions*. **Montes, L. R., Alonso, A. y Bagatolli, L. A.** 2007, Biophysical Journal, Vol. 93, págs. 3548-3554.
13. *Artificial Spectrin Shells Reconstituted on Giant Vesicles*. **Iván López-Montero, Ruddy Rodríguez-García, Francisco Monroy.** 23, 2012, The Journal of Physical Chemistry Letters, pág. 1583-1588.
14. *Interaction of bovine erythrocyte spectrin with aminophospholipid liposomes*. **K. Michalak, M. Bobrowska, A.F. Sikorski.** 12, 1993, Gen. Physiol. Biophys., págs. 163-170.

15. *Interaction of membrane skeletal proteins with membrane lipid domain.* **Sikorski, Aleksander F., y otros, y otros.** 2000, Acta Biochimica Polonica, Vol. 47, págs. 565-578.
16. *Mapping of an ankyrin-sensitive, phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine mono- and bi-layer binding site in erythroid beta-spectrin.* **Hryniewicz-Jankowska, Anita, y otros, y otros.** 2004, Biochem. J., Vol. 382, págs. 677-685.
17. *Subdiffusive fluctuation dynamics of rigid membranes as resolved by ultrafast videomicroscopy.* **R. Rodríguez-García, M.Mell, I. López-Montero, F. Monroy.** 2, 2011, Europhysics Letters, Vol. 94, pág. 28009 .
18. *Direct Cytoskeleton Forces Cause Membrane Softening in Red Blood Cells.* **Ruddi Rodríguez García, Iván López-Montero, Michael Mell, Gustavo Egea, Nir S. Gov, Francisco Monroy.** 2015, Vol. 108, págs. 2794-2806.
19. *Lipids of Human Red Blood Cell Membrane: normal composition and variability in disease.* **Cooper, R.** 1970, Vol. 296.
20. **Finegold, L.X.** *Cholesterol and Membrane Models.* Boca Raton FL : CRC Press, 1993.
21. **Luckey, Mary.** *Membrane Structural Biology with biochemical and biophysical foundations.* New York : Cambridge University Press, 2008.
22. *Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles.* **Pécreaux, J., et al.,.** 3, 2004, European Physical Journal E, Vol. 13, págs. 277-290.
23. **Sackmann, E.** Biological membranes: architecture and function. *Handbook of biological physics.* 1995, Vol. 1.
24. **Boal, David.** *Mechanics of the Cell.* Segunda edición. United Kingdom : Cambridge University Press, 2012.

Parte III

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

CAPÍTULO 7:

DISCUSIÓN INTEGRADORA

Tal y como se detalla en los *capítulos 4 – 6* de resultados, el objetivo principal en esta tesis doctoral es la comprensión de la energética física y de los mecanismos físicos implicados en la dinámica funcional del citoesqueleto celular. Para ello se ha abordado un estudio experimental sobre la elasticidad y la fluidez de las membranas artificiales involucradas en modelos biomiméticos de los sistemas reales, así como de sus consecuencias estructurales.

Con el objetivo de estudiar la energética y la dinámica de estos sistemas relevantes se han empleado distintos sistemas biomiméticos de estudio basados en membranas lipídicas modelo. Se incluyen proteínas relevantes que interaccionan con los lípidos para conseguir la mayor fidelidad posible en el modelo biomimético con respecto al sistema biológico real. En primer lugar, se ha estudiado la energética implicada en los procesos de adhesión mediada por cadherinas y los efectos que producen en la membrana dichas adhesiones. Como se muestra en el *capítulo 4* de esta tesis, se ha observado que sólo con el ectodominio de la cadherina basta para poder obtener adhesiones muy fuertes, observándose a nivel nanométrico mediante la técnica de *crio*-TEM, estructuras con características muy similares a las observadas en las uniones celulares. El sistema modelo de membrana está basado en un lípido formador de bicapas, DOPC, y un lípido que se emplea como anclaje con las histidinas del C_t de la proteína, manteniendo una unión de tipo covalente coordinado, NTA-Ni. La concentración de la proteína presente en la membrana es clave para obtener uniones entre dos vesículas, y así estudiar sistemas más simples, y sistemas más complejos formados por más de tres vesículas que recuerdan a la estructura morular en la etapa inicial de proliferación celular del desarrollo embrionario, proceso en que la expresión de proteínas de adhesión es clave para un correcto crecimiento y desarrollo posterior. Siempre y cuando esté presente el calcio en el medio se producirá la adhesión específica, es decir, mediada por proteína. La carencia de calcio en el medio supone que sólo se produzcan interacciones inespecíficas entre vesículas de tipo electrostático, las cuales, a diferencia de las específicas, tienen una intensidad cuatro órdenes de magnitud menores que las específicas en unidades de $K_B T$, una diferencia energética muy importante que explica la estabilidad de las estructuras celulares cohesionadas por cadherina. Esta fuerte estabilidad se ve reflejada en la práctica irreversibilidad de la adhesión frente a las fuerzas entrópicas. La adhesión específica mediada por cadherina se puede revertir tan solo mediante separación bajo fuerzas mecánicas de tracción. En un sistema modelo de reversibilidad adhesiva de dos vesículas aspiradas con micropipetas enfrentadas, se ha determinado que si la tensión de la membrana no es suficiente para superar las fuerzas adhesivas, la vesícula no es capaz de mantener unida la membrana, por lo tanto, se rompe. En el *capítulo 4* de esta tesis se consideran uniones intervesiculares que describen razonablemente los procesos adhesivos a los cuales se encuentra sometida una membrana lipídica. Se ha tenido en cuenta un modelo simple en el que la cadherina únicamente se encuentra unida artificialmente a la membrana mediante una unión covalente, y no a la red de citoesqueleto mediante el sistema de cateninas, por lo que se aporta información relevante de la mecánica de la membrana lipídica frente al estrés producido por la adhesión, pero no de la transducción de fuerza hacia la red de citoesqueleto subyacente en el sistema real. Estos resultados podrían ser relevantes en el estudio cuantitativo de procesos de membrana implicados en la diferenciación celular.

Para estudiar los efectos mecánicos de los filamentos flexibles que constituyen el esqueleto celular asociado a la membrana, se han llevado a cabo estudios reológicos tanto de actina, constituyente básico y esencial del citoesqueleto eucariota y cuyos filamentos activos integran el entramado gelificado que constituye el córtex celular, y de espectrina, proteína que forma la red bidimensional del esqueleto de membrana en el glóbulo rojo. Se han llevado a cabo estudios de sus propiedades mecánicas en equilibrio y en el régimen lineal de deformaciones. Dichos resultados se encuentran detallados en el *capítulo 5*, para el caso del estudio de las propiedades mecánicas de la actina, y en el *capítulo 6* en el caso de las monocapas constituidas por POPC en presencia de membrana de eritrocito, la cual contiene la espectrina como proteína de estudio.

Las monocapas en presencia de espectrina resultan mucho más fluidas que las obtenidas en presencia de actina. Estos resultados tan distintos para dos proteínas de citoesqueleto son los esperados, dado que ambas proteínas desempeñan papeles distintos en la membrana. La actina es una proteína soluble con carácter estructural, que aporta rigidez a la membrana a través de la formación de una red tridimensional gelificada (córtex) que se organiza subyaciendo a la membrana. La red es activa, es decir, bajo consumo de ATP, los filamentos que la constituyen se encuentran en proceso continuo de polimerización por un extremo y despolimerización por el otro, produciendo un movimiento direccional como una cinta de correr (treadmilling), que es responsable del desarrollo de fuerzas dirigidas hacia el exterior del córtex, forzando a la membrana a permanecer tensionada bajo el efecto de dicha tensión cortical. Sin embargo, en el caso de la espectrina, se trata de la proteína estructural del glóbulo rojo, un modelo de célula no nucleada que no contiene ningún orgánulo ni estructura citoesquelética tridimensional en el citoplasma. Consecuentemente, el citoplasma del grupo rojo es un mero fluido hidrostático que no ofrece ningún tipo de soporte estructural a la forma requerida de este tipo celular. Debemos recordar que la forma discoidal del grupo rojo es esencial para conseguir la plegabilidad celular necesaria para poder atravesar capilares sanguíneos de diámetro inferior al tamaño celular. Si la célula fuera esférica, como correspondería a la mera acción hidrostática del citoplasma, los glóbulos rojos taponarían inmediatamente la circulación capilar, colapsando por tanto el sistema cardiovascular. El esqueleto de espectrina es una estructura rígida bidimensional asociada a la bicapa lipídica a través de nodos y enganches específicos. Dicha red bidimensional ofrece la rigidez suficiente para el mantenimiento de la forma celular, y al tiempo la flexibilidad necesaria para que la célula pueda adaptar las deformaciones que debe soportar a los elevados flujos y esfuerzos de cizalla a las que es sometida la célula al pasar por los distintos vasos sanguíneos.

Para el estudio de las propiedades mecánicas de la actina como proteína que forma el córtex celular, se presentaron dos sistemas modelo de unión a la membrana diferentes, uno mediante un abordaje electrostático, en el cual la actina se une a la membrana a través de un sistema de cargas con un lípido catiónico, y un abordaje covalente, en el que la proteína se une mediante una interacción covalente de un grupo funcional succinimida. La rigidificación observada de la membrana en presencia de actina reafirma su papel como un factor estructural en las membranas, sin embargo, en presencia de ATP se produce una fluidificación de la membrana. Esta fluidificación de la monocapa se debe a que la proteína actúa como un sistema tractor, ejerciendo una fuerza sobre la membrana al hidrolizar las moléculas presentes de ATP.

En el estudio de las propiedades mecánicas de la espectrina, en el *capítulo 6*, se observó la fluidificación de la monocapa en los experimentos de isothermas de compresión ésta fluidez es la que hace posible que el eritrocito sea capaz de soportar las grandes deformaciones a las que es sometido. Para el estudio de las propiedades mecánicas de la espectrina no sólo se han empleado técnicas de estudio de monocapas de Langmuir, sino que también se ha realizado un estudio de estabilidad termodinámica en base a la cantidad de proteína presente en la muestra. Adicionalmente, se ha realizado un estudio experimental en el que se obtienen las propiedades mecánicas en función de la complejidad del sistema mediante la técnica de análisis de fluctuaciones.

Como se muestra en el cuadro sinóptico de estos resultados (tabla 6.3-1), a medida que aumenta la complejidad del sistema (mayor número de componentes lipídicos y proteínas de citoesqueleto), éste se vuelve más fluido, observándose los mayores valores de rigidez en los sistemas compuestos únicamente por lípido sintético en composición de membrana interna. En presencia de proteína activa en el sistema, es decir, en presencia de ATP, se produce un aumento de la rigidez de la membrana, sin embargo la tensión lateral prácticamente no se ve afectada. Este resultado indica el fuerte efecto mecánico que ejerce el metabolismo activo del citoesqueleto de membrana, produciendo una rigidificación respecto del sistema inactivo que da cuenta de la importancia del sostenimiento de las estructuras citoesqueletales para el mantenimiento de la función mecánica de la célula.

El efecto mecánico de la espectrina en la membrana del eritrocito es claro, la espectrina ejerce de malla estructural para el eritrocito soportando así las variaciones a las que es sometido aumentando la flexibilidad de la membrana. La espectrina se une a la membrana a través de complejos proteicos en los que la actina también se encuentra presente.

La formación de esta red de espectrina conectada con la membrana interna hizo que ahondásemos en el problema estructural desde el punto de vista lipídico. Es por ello que se ha desarrollado el estudio del diagrama de fases cuaternario con los principales lípidos que conforman la membrana interna, es decir, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y colesterol, siendo la fosfatidiletanolamina uno de los lípidos más importantes, junto con el colesterol, de la membrana interna. Los resultados obtenidos en este estudio han desvelado el importante papel estabilizador de la espectrina hacia los lípidos, en ausencia de la misma se forma una zona amplia de no formación y de formación con segregaciones lipídicas, siendo éstas muy ricas en fosfatidiletanolamina, sin embargo, la adición de espectrina provoca la estabilización de las segregaciones lipídicas, siendo esta zona del diagrama más pequeña que en ausencia de proteína. Cuando la espectrina está activa, es decir, en presencia de ATP se observa la formación de la red esquelética observada al reconstituir la membrana del eritrocito al completo.

Los resultados discutidos anteriormente representan un paso adelante en los estudios biofísicos en torno al citoesqueleto de las membranas biológicas empleando técnicas de reconstitución parcial en sistemas modelo. Este desarrollo nos ha permitido poder entender el funcionamiento estructural de las tres proteínas de estudio con papeles biológicos distintos en base a sistemas más simples.

CAPÍTULO 8:

CONCLUSIONES

La presente tesis doctoral permite extraer conclusiones acerca de los efectos que producen distintas proteínas, relacionadas con el esqueleto celular, al interactuar con las membranas biológicas a las que se encuentran asociadas.

A medida que hacemos aumentar la complejidad del sistema, nos hemos ido acercando a un sistema cada vez más realista, desde el simple pegado de una proteína a la membrana, ya sea mediante medios de interacción electrostática o mediante interacción covalente, hasta la reconstitución parcial de la membrana del glóbulo rojo. Hemos estudiado tanto la interacción *intervesicular*, al realizar los estudios de adhesión mediada por cadherinas, como las interacciones internas *lípidos – proteína*, al estudiar la interacción de la actina con la membrana y el efecto que produce la inserción del esqueleto del eritrocito en la estabilidad de la membrana interna.

Las conclusiones principales de este trabajo son:

1) Sistema membrana/cadherina. La presencia del ectodominio de cadherina en las membranas lipídicas favorece una fuerte adhesión sin la necesidad de tener presente todo el complejo adhesivo (ectodominio, dominio transmembrana y complejo de cateninas). Se ha observado que a partir de una determinada concentración de proteína, la energía de adhesión permanece constante y la cinética de adhesión se torna más lenta debido a que se producen clústeres de cadherinas que impiden el transporte lateral de las mismas. Por encima de una determinada concentración de cadherina, las cremalleras de adhesión son suficientemente extensas que las membranas adhesivas se encuentran fuertemente unidas a través de esas uniones adhesivas (*tight junctions*) formando estructuras morulares con bordes poligonales como se observó en el *capítulo 4* al realizar los estudios microestructurales. El interés de este estudio, y por lo tanto, los resultados obtenidos, se debe a la formación de la mórula embrionaria en el proceso de diferenciación celular, para poder llevarlo a la aplicación como un material bioadhesivo dependiente de calcio.

2) Sistema membrana/actina. La evidencia de la actividad de membrana inducida *in vitro* al realizar un córtex artificial con actina ha demostrado que la actina tiene dos papeles fundamentales y opuestos cuando actúa en el citoesqueleto celular. La actina tiene un papel como rigidificador, lo cual es fundamental para poder mantener la estabilidad en la membrana y estructuras características de cada tipo celular, y también proporciona una energía adicional al movimiento térmico de la membrana al realizar la hidrólisis del ATP a ADP, energía que proviene de los motores moleculares que la componen.

3) Sistema membrana del glóbulo rojo/espectrina. El esqueleto del glóbulo rojo aporta propiedades de flexibilidad mecánica y estabilidad termodinámica a los lípidos presentes en la membrana interna del mismo, estabilizando altos contenidos en lípidos que, por sí mismos no son capaces de formar bicapas lipídicas, al interactuar con la proteína esquelética. Esta flexibilidad aportada por las proteínas esqueléticas, en particular con la espectrina, es la que permite que la célula sea capaz de soportar grandes variaciones de presión y altas compresiones.

Parte IV:

RESUMEN DE LA TESIS

Resumen:**Reconstitución artificial de proteínas asociadas a citoesqueleto en sistemas modelo de membrana: un estudio biofísico de su función mecánica****Introducción y objetivos**

En la presente tesis doctoral se ha realizado el estudio de la función mecánica de tres proteínas que son básicas para el desarrollo de la vida a nivel celular. Las tres proteínas de estudio son la cadherina, la actina y la espectrina. Todas ellas están relacionadas con el esqueleto celular eucariota, las dos primeras formando parte esencial del córtex celular asociado a la membrana y la espectrina siendo la proteína básica del esqueleto de membrana del glóbulo rojo.

Las **cadherinas** son moléculas hemofílicas que se caracterizan por interactuar solamente con moléculas de la misma familia y son las responsables de la formación de contactos célula-célula estables en presencia de iones calcio. La familia de las cadherinas es particularmente importante en los procesos dinámicos de regulación de los contactos adhesivos que están a su vez relacionados con diversos procesos morfogénicos y de desarrollo. Las cadherinas están formadas por tres fragmentos claros, un dominio extracelular formado por cinco ectodominios globulares (*ectodominio*), un dominio helicoidal transmembrana y un dominio intracelular, el cuál interactúa con el citoesqueleto a través de un complejo proteico de cateninas. En esta tesis doctoral se realiza el estudio adhesivo a través del ectodominio completo obtenido a partir de la transformación genética de la cadherina eucariota. El objetivo de trabajo con esta proteína es estudiar la energética del proceso adhesivo entre dos vesículas a partir de los ángulos de contacto y módulo de rigidez, así como estudiar la dinámica del contacto adhesivo entre dos vesículas y su reversibilidad mediante fuerzas de tracción mecánica y tensión lateral de membrana ejercida con la técnica de manipulación de micropipetas, y la microestructura del contacto adhesivo gracias a la crio-microscopía de transmisión electrónica.

La **actina** es un constituyente básico y esencial en el citoesqueleto eucariota, cuyos filamentos activos integran el entramado gelificado que constituye el córtex celular. Es una estructura sumamente dinámica que se reorganiza continuamente mientras la célula cambia de forma, se divide, y responde a su entorno. El objetivo de trabajo con esta proteína se basa en el estudio reológico de las propiedades mecánicas en sistemas bidimensionales – monocapas de Langmuir – a través de dos tipos de interacciones, el llamado *escenario electrostático*, donde se produce una interacción débil entre la proteína de citoesqueleto y la membrana lipídica, y el llamado *escenario covalente*, en el que se produce una interacción fuerte en la que no solo tienen lugar interacciones electrostáticas, también hay una aportación covalente a través de un punto de anclaje específico. Para las interacciones electrostáticas se emplea un lípido catiónico (DODA) que interactúa con la carga neta negativa de la proteína, y para las interacciones covalentes se emplea un lipopolímero de polietilenglicol con un grupo succinimida que es capaz de reaccionar con los residuos de lisinas y cisteínas de la proteína formando una unión covalente.

Metodología

La **espectrina**, la tercera proteína de estudio en esta tesis doctoral, es la proteína que forma la red bidimensional del esqueleto de membrana en el glóbulo rojo. La membrana plasmática del glóbulo rojo es un modelo celular muy estudiado debido a que es una célula que carece de núcleo y orgánulos internos, convirtiéndolo en un sistema ideal para hacer un estudio de las propiedades físicas de una membrana compleja dotado con un esqueleto de membrana. Este estudio no sólo se basa en las propiedades mecánicas de la proteína, sino también de los lípidos implicados con la misma, es decir, los presentes en la membrana interna del glóbulo rojo. Los objetivos principales de trabajo con esta proteína son realizar el estudio reológico de la membrana del glóbulo rojo mediante experimentos con monocapas de Langmuir, es decir, un estudio bidimensional, así como la reconstitución del extracto de membrana en sistemas modelo basado en la composición lipídica de la membrana interna, empleando como sistemas modelo las GUVs, y la realización del diagrama de fases de los lípidos que constituyen la membrana interna del glóbulo rojo y efecto de la inserción del extracto de membrana en sus propiedades.

Cada uno de los estudios realizados en estas proteínas, contribuirá a arrojar la información fundamental para poder alcanzar el **objetivo fundamental**, ya mencionado, de esta Tesis Doctoral:

La comprensión de la energética y los mecanismos que engendran la dinámica funcional del citoesqueleto celular, los cuales permiten el mantenimiento de un programa funcional de mecánica celular (software) que ejecutado a través de los elementos biomoleculares del citoesqueleto (hardware), posibilitan la funcionalidad mecánica de la célula.

Metodología

Para poder realizar el estudio de la mecánica y energética de dichas proteínas, se realiza la reconstitución en sistemas modelo, de este modo se pueden estudiar sus funciones biológicas y propiedades mecánicas en un entorno óptimo. Los sistemas modelo lipídicos empleados en este trabajo son las monocapas de Langmuir y los liposomas, los cuales, dependiendo de la técnica de caracterización que se vaya a emplear, serán vesículas unilamelares grandes (LUVs) o vesículas unilamelares gigantes (GUVs).

Las monocapas de Langmuir se preparan mediante un proceso de esparcimiento de una fase orgánica, compuesta por uno o más lípidos disueltos en cloroformo, sobre una fase acuosa (subfase) que contiene el medio tamponado. Para el estudio de las proteínas y evitar su desnaturalización, una vez se ha evaporado el disolvente de la fase orgánica y la monocapa está formada a una presión inicial determinada, se inyectan en la subfase donde tiene lugar la interacción lípido – proteína. Establecida dicha interacción, se realizan experimentos de compresión – expansión e isotermas de compresión en la *balanza de Langmuir* de los cuales se obtienen los módulos característicos de compresibilidad (ϵ) y la viscosidad del sistema (η), y en un *reómetro* donde se obtiene el módulo de cizalla (μ) correspondiente a la monocapa. Se podría decir que son experimentos bidimensionales de los cuales, a partir de la variación de presión (π) frente a la variación de área por molécula (A), se obtienen propiedades termodinámicas del sistema de estudio, en este caso un sistema compuesto por lípidos y proteínas.

Las vesículas unilamelares grandes (LUVs), en esta tesis se emplean para el estudio de la microestructura de la adhesión mediada por cadherinas²³. Para poder obtener las LUVs se forma una película lipídica de la composición deseada y se re-suspende con la disolución tamponada empleada en el experimento. De este modo se obtiene una suspensión no homogénea de liposomas de distintos tipos y tamaños. Para obtener vesículas unilamelares, la mezcla se hace pasar a través de un extrusor manual que contiene un filtro de polycarbonato con un tamaño de poro determinado un número impar de veces, obteniéndose una mezcla homogénea de liposomas con el mismo tamaño.

Las vesículas unilamelares gigantes (GUVs), en este trabajo se obtienen mediante la técnica de electroformación, la cual consiste en la deposición de una película lipídica sobre dos placas conductoras de ITO (óxido de indio y estaño). Las placas ITO se ensamblan de tal manera que forman una cámara para la formación de las GUVs, la cual se conecta a un generador de corriente alterna mediante unos hilos conductores, en nuestro caso, de cobre. Para evitar pérdidas, la cámara se sella con pasta Vitrex una vez se rellena de la disolución del medio interno, por lo general una disolución de sacarosa. Este sistema modelo es el más empleado debido a que su tamaño es muy similar al de una célula ($\approx 30 \mu m$ de diámetro).

En este trabajo, las GUVs son el sistema modelo más empleado ya que mediante el empleo de distintas técnicas de caracterización como son la microscopía óptica, microscopía de fluorescencia, microscopía confocal, se obtienen características estructurales; con la técnica de análisis de fluctuaciones, se obtienen parámetros mecánicos como el módulo de flexión y la tensión de la membrana; y con técnicas de manipulación con micropipetas se puede realizar la manipulación de una única vesícula.

Resultados

Aquí se presentan los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral:

- *Capítulo 4 – Mecánica de adhesión celular mediada por C-Cadherinas*

En este capítulo se realiza el estudio de la energética del proceso adhesivo así como los procesos dinámicos adhesivos y la microestructura que forman estas proteínas una vez adheridas.

Se ha replicado el proceso de adhesión celular en un sistema modelo basado en el ectodominio de la proteína. El ectodominio modificado genéticamente, presenta una cola de seis histidinas en el C_t y se une a la membrana a través de un enlace covalente coordinado con el lípido NTA-Ni. Se ha mostrado la importancia de los cationes calcio frente a las interacciones inespecíficas, ya sea en ausencia de cadherina (interacción electrostática), o en presencia de cadherina (interacción específica), frente a iones monovalentes (K^+) o divalentes (Mg^{2+}) cual sería la interacción electrostática de las GUVs; como en los procesos de adhesión específica, en los que la presencia de calcio aporta funcionalidad al ectodominio de la cadherina, con su consecuente incremento en las fuerzas de adhesión y por lo tanto, energías de adhesión.

²³ Ver capítulo 4

Resultados

La energía de adhesión de membrana regulada por cadherina resulta enormemente favorable en presencia de Ca^{2+} . La interacción adhesiva está caracterizada por una energía elevadísima, de orden de $10^4 k_B T$, a densidades de proteína suficientemente altas. Se ha observado la reversibilidad de la adhesión de cadherinas frente a acciones mecánicas o mediante la eliminación de los iones Ca^{2+} del medio con agentes quelantes, pudiendo emplearse como biomaterial adhesivo. Se ha obtenido la microestructura de la unión del ectodominio entre vesículas mediante la técnica de *crio-TEM*, observándose una cierta continuidad y un espacio regular en los clúster de cadherinas.

Se podría aventurar a decir que el calcio, no sólo da la funcionalidad a la proteína, sino que es probable que éste medie la adhesión, aproximando las dos membranas y disminuyendo las fuerzas de repulsión de la doble capa eléctrica, y una vez superada esa distancia dé comienzo la adhesión específica con una cinética que se podría decir que es difusiva de tipo cremallera.

- *Capítulo 5 – Estudio reológico de la actina como proteína de citoesqueleto*

En este capítulo se realiza el estudio de las propiedades mecánicas de sistemas modelo bidimensionales basados en actina mediante un doble abordaje experimental.

Se han propuesto dos escenarios distintos para el anclaje de actina, uno puramente electrostático a través de lípidos catiónicos y otro electrostático combinado con el anclaje covalente a través del grupo funcional succinimida. En ambos casos, la unión a la membrana en la disolución tamponada de polimerización se observó mediante la microscopía de fluorescencia. Se realizó un estudio reológico con monocapas de Langmuir para ambos escenarios mediante ensayos mecánicos de compresión y cizalla. Cuando la concentración de proteína se encuentra por debajo del valor crítico de “filamento enmarañado”, la membrana sigue siendo fluida ($G' = 0$) independientemente de la naturaleza del elemento de anclaje. En los experimentos de compresión, se observa un refuerzo a la membrana cuando se encuentra unida la actina, como se esperaba debido a la gran rigidez intrínseca de los filamentos. Sin embargo, la superficie de viscosidad se comporta diferente en cada tipo de anclaje. En el marco electrostático no se detectó ningún tipo de impacto, pero si se observó una disminución significativa cuando la actina se une covalentemente a la membrana. En el primer caso, los filamentos de actina son adsorbidos físicamente a la membrana, por lo que son capaces de deslizarse libremente bajo flujo. Para la unión covalente, los movimientos de actina aumentan el transporte de membrana dando como resultado una aparente mayor fluidez. Esto constituye una evidencia seminal de la “actividad de membrana” inducida *in vitro* mediante una unión con F-actina.

- *Capítulo 6 – Glóbulo rojo como sistema modelo: diagrama de fases y mecánica.*

En este capítulo se realiza el estudio de la membrana del glóbulo rojo mediante experimentos de reología (2D) como de reconstitución en sistemas modelo (3D), así como el diagrama de fases de los lípidos que constituyen la membrana interna del mismo. Se ha corroborado que las proteínas de citoesqueleto aportan unas propiedades mecánicas de flexibilidad y estabilidad a los lípidos de la membrana que podrían estar relacionadas con la elevada deformabilidad celular que permite al glóbulo rojo circular por el torrente sanguíneo con gran facilidad.

dad. También que las proteínas del eritrocito admiten grandes cantidades de PE en condiciones fisiológicas debido a la interacción estabilizante de la PE con la espectrina del citoesqueleto.

Se ha observado que las membranas son más fluidas en presencia de citoesqueleto y éste aporta una mayor estabilidad, soportando altas variaciones de presión a altas compresiones.

Se ha estudiado el comportamiento de la membrana interna del eritrocito en función de la variación de colesterol en la membrana observándose una zona de estabilidad que incluye a la composición fisiológica. Adicionalmente, existen zonas del diagrama de fases de formación de vesículas con segregaciones de PE, siempre próximo al límite de no formación o de inestabilidad de la membrana, tanto en composición puramente de lípido sintético de membrana interna como con la adición a esa mezcla de extracto de membrana de RBC.

Conclusiones

A medida que aumenta la complejidad del sistema, nos hemos ido acercando a un sistema cada vez más realista, desde el simple pegado de una proteína a la membrana, ya sea mediante medios de interacción electrostática o mediante interacción covalente, hasta la reconstitución parcial de la membrana del glóbulo rojo. Hemos estudiado tanto la interacción *intervesicular*, al realizar los estudios de adhesión mediada por cadherinas, como las interacciones internas *lípido – proteína*, al estudiar la interacción de la actina con la membrana y el efecto que produce la inserción del esqueleto del eritrocito en la estabilidad de la membrana interna.

Las conclusiones principales se podrían enumerar según:

4) La presencia del ectodominio de cadherina en las membranas favorece una fuerte adhesión sin la necesidad de tener presente todo el complejo. Se ha observado que a partir de una concentración de proteína, la energía de adhesión permanece constante y la cinética de adhesión se torna más lenta debido a que se producen los clústeres de cadherinas más grandes y, por lo tanto, las cremalleras de adhesión son mayores, formando estructuras con bordes poligonales como se observó en el *capítulo 4* al realizar los estudios microestructurales.

5) La evidencia de la actividad de membrana inducida *in vitro* al realizar un córtex artificial con actina, ha demostrado que la actina tiene dos papeles fundamentales y opuestos cuando actúa en el citoesqueleto celular. La actina tiene un papel como rigidificador, lo cual es fundamental para poder mantener la estabilidad en la membrana y estructuras características de cada tipo celular, y también proporciona una energía adicional al movimiento térmico de la membrana al realizar la hidrólisis del ATP a ADP, energía que proviene de los motores moleculares que la componen.

6) El esqueleto del glóbulo rojo aporta propiedades mecánicas de flexibilidad y estabilidad a los lípidos presentes en la membrana interna del mismo, estabilizando altos contenidos en lípidos que por sí mismos no son capaces de formar bicapas lipídicas, al interactuar con la proteína esquelética. Esta flexibilidad aportada por las proteínas esqueléticas es la que permite que la célula sea capaz de soportar grandes variaciones de presión y altas compresiones.

Abstract:**Artificial reconstitution of cytoskeleton-associated proteins in membrane model systems: A biophysical study of their mechanical function.****Introduction and objectives**

In the present PhD Thesis we realize a study of the mechanical function of three different proteins that are necessary for life development at cellular level. The targeted proteins are cadherin, actin and spectrin, all of them related with the eukaryotic cell cytoskeleton. Cadherin and actin are essential components of cellular cortex associated to the cell membrane; spectrin is the main skeletal protein of red blood cells.

Cadherins are homophilic molecules that are characterized by only interact with other cadherin family members. They are the responsible, in presence of calcium ions, to form stable cell-cell contacts, so-named adherent junctions. The cadherin superfamily is particularly important in dynamic processes of regulation the adhesive contacts related to morphogenetic and development processes. Cadherin are formed by three different domains: the extracellular domain (*ectodomain*), helicoidally transmembrane domain and intracellular domain that interacts to cytoskeletal network by the catenin complex. In this PhD thesis we perform a biophysical study of the adhesion properties endowed by the whole ectodomain, which is obtained from the eukaryote C-cadherin genetically modified. The aim of this work is study the energetic adhesion process between two vesicles from their contact angle and bending modulus, as well as the dynamic of the adhesion process and their reversibility with mechanical traction forces applied from a micropipette manipulation, and finally the adhesion microstructure with the transmission electron cryo-microscopy.

Actin is a basic and essential component of eukaryote cytoskeleton, which is ubiquitous at different cell emplacements and widespread conserved over the whole eukaryote branch of living organisms. Upon ATP consumption, globular actin (G-actin) is able to polymerize into large and persistent polar filaments, which continuously grow by one end and shrink by the other in a directed motion called treadmilling. The actin filaments (F-actin) are mechanically active, and at concentrations above a critical one they make a jellified framework that forms the cell cortex. It forms a dynamic structure continually reorganized since the cell must modify its shape, divide and responds to the environment. The aim of this work is based on a rheological study of the mechanical properties in actin-cortex-like systems based on Langmuir films of lipids with an underlying actin layer through. Two scenarios are considered: The *electrostatic scenario*, where the protein has a weak interaction with the lipid membrane; and the *covalent scenario*, where the protein has a strong interaction with the lipid membrane because of a specific anchoring lipid. For electrostatic interactions we use a cationic lipid (DODA) that interacts with negative charge of actin, for covalent anchoring we use a poly-ethylenglycol lipopolymer with a succinimide group able to react with lysine and cysteine residues from actin.

The third studied protein is **spectrin**. Spectrin forms the 2D-dimensional skeleton network of the red blood cell membrane (RBC). The plasma membrane of RBC is one of the most studied systems due to RBC has no nucleus nor internal organelles, being an ideal system to study the physical properties of a complex membrane with a membrane skeleton. This study is not only based in the mechanical properties of that protein, we study the inner membrane lipids involved with spectrin too. The aim of this project is realize the rheological study of RBC membrane with Langmuir monolayers, as well as the erythroid membrane extract reconstitution in model systems (GUVs), and an inner membrane phase diagram with synthetic lipids and the effects of the erythroid membrane extract on it.

All of the object protein research will contribute to obtain the **main aim** of that PhD thesis:

The understanding of the energetics and the mechanisms that produce the functional dynamics of cell cytoskeleton, which allows the maintenance of a functional cell mechanics program (software) running through biomolecular cytoskeletal elements (hardware), further enabling the mechanical functionality of the cell.

Methodology

To achieve the objective of the comprehensive study on the mechanics of these membrane protein systems, we will reconstitute them in model membrane systems, so we can study their biological functions and mechanical properties in a biomimetic environment. Lipid model systems employed in this work are Langmuir monolayers and liposomes, which, depending on the characterization technique that is to be used, are large unilamellar vesicles (LUVs) or giant unilamellar vesicles (GUVs).

Langmuir monolayers are prepared spreading an organic phase, composed of one or more lipids dissolved in chloroform, on an aqueous phase (subphase) containing the buffered medium. To prevent denaturation in the studies with proteins, once the lipid spreading solvent has evaporated and the monolayer is formed at a given initial pressure, the proteins are injected into the subphase from where the lipid - protein interaction occurs. Once such interaction is established, isothermal experiments with compression deformations are performed on: A) a *Langmuir balance* which the typical modules compressibility (ϵ) and system viscosity (η) are obtained, and B) in a surface shear rheometer, which allows getting the shear modulus (μ) corresponding to the monolayer. From two-dimensional experiments (in which the pressure variation (π) vs. the variation of area per molecule (A) is obtained), we get the thermodynamic properties of the study system, in this case a system composed of lipids and proteins.

We use large unilamellar vesicles (LUVs) to study the microstructure of cadherin adhesion. LUVs are produced by a lipid film of the desired composition is formed and re-suspended with the buffered solution used in the experiment producing a nonhomogeneous liposome suspension of different types and sizes. To obtain the unilamellar vesicles with, we use a manual extruder with a polycarbonate filter (200 nm of pore size), obtaining a homogeneous mixture of the same size liposomes.

Results

To produce giant unilamellar vesicles (GUVs) we use an electroformation method. This method consists in spread a lipid film on ITO plates (indium tin oxide) forming a conductive cell connected to an AC generator through lead wires, in this case, copper sealed with vitrex paste. The cell is filled with inner medium solution, generally sucrose. GUVs are very used due to their similar cell size (diameter $\approx 30 \mu m$).

In this report, GUVs are the most widely used model systems due to their easy methodology and direct applicability as biomimetic model. With different characterization techniques such as light microscopy, fluorescence microscopy, confocal microscopy we can obtain different structural characteristics; with fluctuation analysis, we can obtain the mechanical parameters such as bending modulus and membrane tension; and with micropipette manipulation techniques can make the manipulation of a single vesicle.

Results

Here we present the results of this PhD thesis:

- *Chapter 4 – Mechanics of cell adhesion mediated with C-Cadherin*

In this chapter, we report the energetic adhesion process as well as the adhesion dynamics and the microstructure formed in adherent junctions.

We artificially reproduce the cell adhesion process in a model system based on the cadherin ectodomain. The ectodomain, genetically modified with a His-tag attached to C_e , binds to membrane with an anchoring lipid (NTA-Ni). It has been shown the importance of calcium cations against nonspecific interactions, either in the absence of cadherin (electrostatic interaction), or in the presence of cadherin (specific interaction), compared to monovalent ions (K^+) or divalent (Mg^{2+}) which would electrostatic interaction of GUVs; and specific adhesion processes, in which the presence of calcium adds functionality cadherin ectodomain, with a consequent increase in the adhesion forces and therefore adhesion energies.

The membrane adhesion energy regulated with cadherin is extremely favourable in presence of calcium ions. The adhesive interaction is characterized for a huge energy ($10^4 k_B T$) at high enough protein densities.

It has been observed reversibility cadherin adhesion either, against mechanical action, or by removing Ca^{2+} medium with chelating agents. This suggests that cadherin can be used as adhesive biomaterial.

It was obtained microstructure binding ectodomain from vesicles by *cryo-TEM* technique, showing certain continuity and regularly spaced in the cluster cadherins.

One might venture to say that calcium not only provides the functionality to the protein, but this is likely to mediate adhesion, bringing the two membranes and reducing the repulsive forces of the electrical double layer, and once overcome this distance specific adhesion start with a kinetic you could say that is diffusive zipper type.

- *Chapter 5 – Rheological study of actin as cytoskeletal protein*

In this chapter, following a double experimental approach, we study the mechanical properties in a two-dimensional model system based on actin.

We have proposed two different scenarios for anchoring actin, a purely electrostatic one (binding actin with cationic lipids) and other electrostatic combined with covalent anchoring (through a succinimide functional group). In both cases, the actin binding to the membrane in the polymerization buffer was observed by fluorescence microscopy. We performed a rheological study with Langmuir monolayers for both scenarios by mechanical compression and shear tests. When the protein concentration is below to the critical value of "entangled filament concentration", the membrane remains fluid ($G' = 0$) regardless of the nature of the anchoring element. In compression experiments, a reinforcement of the membrane is observed when actin is attached, as expected due to the high intrinsic stiffness of the filaments. However, the surface viscosity behaves differently in each type anchor. In the electrostatic scenario any impact was detected, but a significant decrease was observed when actin is covalently bound to the membrane. In the first case, the actin filaments are physically adsorbed to the membrane, so that they are able to slide freely under flow. For covalent binding, actin movement membrane transport increases resulting in a higher bulk flow characterized by a lower effective viscosity. This is an evidence of seminal "membrane activity" *in vitro* induced by F-actin binding.

- *Chapter 6 – The Red blood cell as model system: phase diagram and mechanics*

In this chapter, we realize a study of red blood cell membrane with rheological experiments (2D) and a reconstitution in model systems (3D), as well as a phase diagram of the inner membrane lipids.

The results have confirmed that cytoskeletal proteins provide mechanical properties of flexibility and stability of the membrane lipids that may be associated with high cell deformability that allows the red blood cell circulate easily through the bloodstream. Also erythrocyte proteins allowed the inclusion of large amounts of PE in model membranes under physiological conditions due to the PE stabilizing interaction with cytoskeletal spectrin.

It has been observed that membranes are more fluid in the presence of cytoskeletal proteins and this enables greater stability, supporting high pressure variations at high compressions.

We have studied the behaviour of internal erythrocyte membrane according to the variation of membrane cholesterol observing an area of stability which includes physiological composition. Additionally, there are areas of the phase diagram of forming vesicles with PE segregations, always close to the limit of no, or unstable, formation of the membrane, both purely synthetic lipid composition of inner membrane and with the addition to the mixture of extracted RBC membrane.

Conclusions

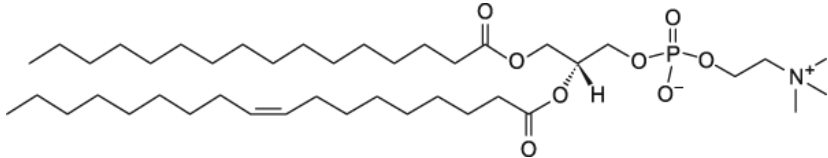
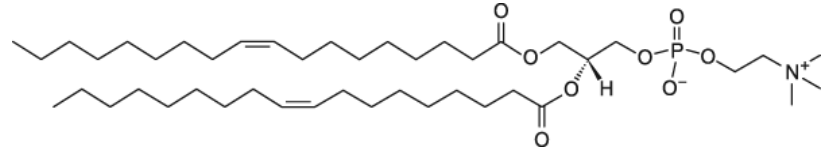
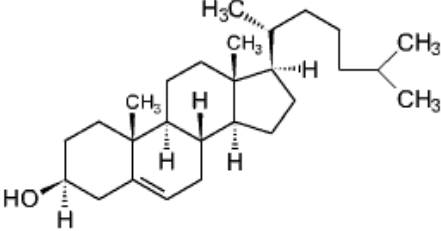
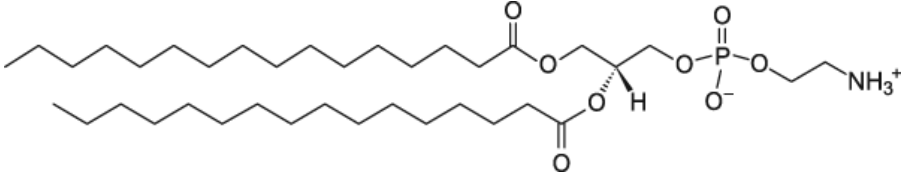
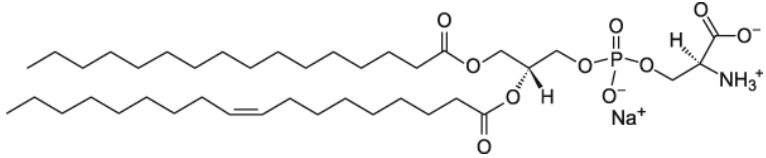
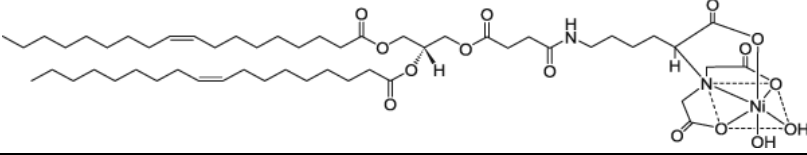

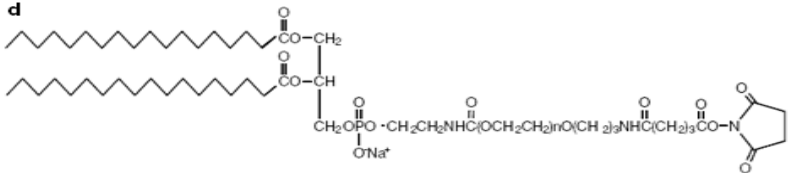
With increasing system complexity, we have to come closer to an increasingly realistic system from sticking simple protein to the membrane, either by means of electrostatic interaction or by covalent interaction, to the partial reconstitution of red blood cell membrane. We have studied both *interventricular* interactions in conducting studies of adhesion mediated by cadherins, such as internal *lipid – protein* interactions, to study the interaction of actin with the membrane and the effect of the insertion of the skeleton of the erythrocyte in stability the inner membrane.

The main conclusions of this work can be summarized as:

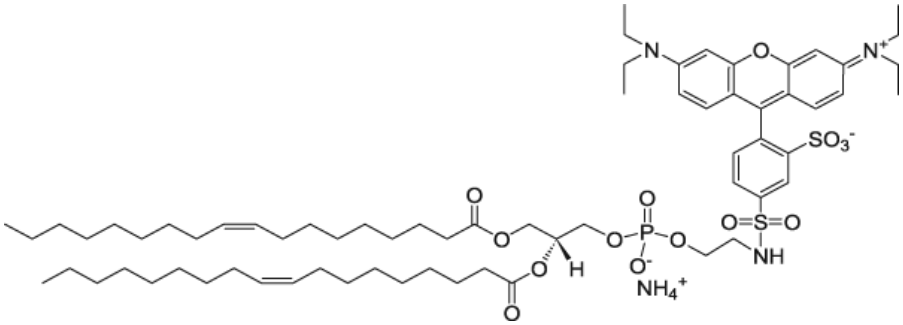
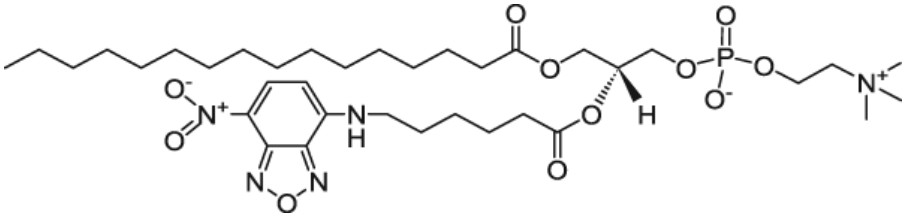
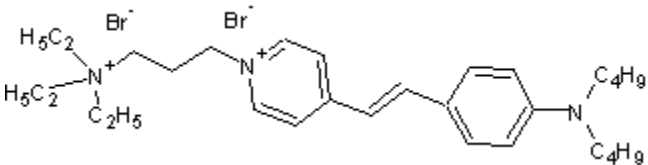
- 1) The presence of cadherin ectodomain in membranes promotes strong adhesion without the need to present the entire complex. It has been observed that from protein concentration, the adhesion energy remains constant and kinetics of adhesion becomes slower because larger cadherins clusters occur and, therefore, zippers adhesion are higher, forming structures with polygonal edges.
- 2) Evidence of membrane activity induced *in vitro* to make an artificial actin cortex has shown that actin has two main and opposing roles when acting on the cell cytoskeleton. Actin has a role as a stiffener, which is essential to maintain stability in the membrane structures and characteristics of each cell type, and also provides additional energy to thermal motion of the membrane to carry out the hydrolysis of ATP to ADP, energy that comes from the molecular motors that compose it.
- 3) The red blood cell skeleton provides mechanical properties of flexibility and stability to the lipids present in the inner membrane of the same stabilizing high lipid content, which themselves are not capable of forming lipid bilayers, when interact with skeletal protein. This flexibility provided by the skeletal protein is one that allows the cell to be able to withstand great variations in pressure and high compression.

ANEXOS

Anexo 1: Estructuras de los distintos lípidos.

Estructura del lípido	Nombre
	POPC
	DOPC
	Colesterol
	DPPE
	POPS
	DOGS-NTA
	DODA
<p>d</p> 	Sunbright

Anexo 2: estructura de las sondas fluorescentes lipídicas

Estructura de la sonda fluorescente	Nombre
	Rh-PE
	NBD-PC
	FM-1-43

